



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

“EFECTO DEL PROCESAMIENTO EN EL
CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y
LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE
DIFERENTES VARIEDADES DE FRIJOL
(*Phaseolus vulgaris* L.) MEXICANO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA:
JENNYEPHER MARTÍNEZ DOTOR

ASESOR ACADÉMICO:
DRA. LETICIA XOCHITL LÓPEZ MARTÍNEZ

ASESOR ADJUNTO:
DR. OCTAVIO DUBLÁN GARCÍA

TOLUCA, MÉXICO
Agosto, 2013



Toluca, México, 21 de junio de 2013

P. Q. en A. JENNY PHER MARTÍNEZ DOTOR
FACULTAD DE QUÍMICA, UAEM
P R E S E N T E

La Dirección de la Facultad de Química de la UAEM, comunica a Usted que el Jurado de su Evaluación Profesional, en la modalidad **TESIS**, estará formado por:

QFB. CYNTHIA ELENA ENRÍQUEZ GARCÍA
PRESIDENTE

Dr. JUAN OROZCO VILLAFUERTE
VOCAL

Dra. LETICIA XOCHITL LÓPEZ MARTÍNEZ
SECRETARIO

M. en C. FELIPE CUENCA MENDOZA
SUPLENTE

Sin más por el momento le envío un respetuoso saludo.

ATENTAMENTE
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO
"2013, 50 Aniversario Luctuoso del Poeta Heriberto Enriquez"

M. en A. P. GUADALUPE OFELIA SANTAMARÍA GONZÁLEZ
DIRECTORA



U. A. E. M.
FACULTAD DE QUÍMICA
DIRECCION

C.c.p. Expediente
c.c.p. Archivo.

DEDICATORIAS

A Dios, por el maravilloso regalo de la vida y por estar conmigo, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía.

A mis padres, por ser el refugio donde almaceno todos mis sueños, por alentarlos y confiar en mí. A ustedes por su esfuerzo constante, sus consejos y sus valores. Por la perseverancia que los caracteriza y que me han infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante, pero más que nada, por su amor.

A mis hermanos, por ser mis amigos desde la infancia, por su incomparable alegría y su corazón de niños, por su valentía y sobre todo por tanto cariño.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Dr. Octavio Dublán por ser un amigo entrañable, por su optimismo, sus consejos oportunos, porque con su ejemplo de vida me hizo seguir en el camino en los momentos de flaqueza, por su lindo corazón. Gracias

A mi asesora Dra. Leticia López, por creer en mí, por la confianza, los consejos, la paciencia, por el tiempo invertido en éste trabajo y por compartir conmigo su conocimiento.

A mis revisores, Dr. Orozco por su apoyo en la resolución de mis dudas constantes, por su amistad y alegría. QFB Cynthia por el tiempo invertido en la revisión de éste trabajo y sus acertadas observaciones.

A mi primo y amigo Paco, por su cariño, por el interés que muestra en mis asuntos, por confiar en mí y estar a mi lado en los momentos importantes de mi vida.

A mi abuelita por su ternura y cariño, por sus oraciones y por ser extraordinaria maestra de vida. A mi sobrino Axel por su inocencia y su amor incondicional.

A mis tíos Francisco y Lulú, mi cuñado César y mi abuelito por formar parte de mi familia y estar presentes en cada paso que doy.

A mis amigos, los de ayer, los de hoy y los de toda la vida. A Carlos y Perla porque nuestra amistad no conoce tiempo ni distancia. A mis amigos Magaly, Graciela, Lizette, Anita, Elo, Yera y Emmanuel porque hicieron de mi trayecto en la universidad una etapa divertida de mi vida con sus travesuras y ocurrencias.

A la Universidad Autónoma del Estado México y la Secretaría de Investigación y Estudios Avanzados por el financiamiento y apoyo en el proyecto con clave 3216/2012CHT, el cual fue otorgado mediante el Departamento de Proyectos de Investigación con financiamiento UAEM.

Al laboratorio de Manejo Poscosecha del Instituto Tecnológico de Veracruz, por la realización de los experimentos de actividad antioxidante.

RESUMEN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa con mayor producción en el mundo y es considerado una buena fuente de compuestos bioactivos entre ellos compuestos fenólicos, a los cuales se les han atribuido propiedades benéficas a la salud, entre las que destaca su capacidad antioxidante. El objetivo de este estudio fue evaluar la retención de componentes bioactivos y capacidad antioxidante contra los radicales $ABTS^{\cdot+}$ y $DPPH^{\cdot-}$ de 5 variedades de frijol consumido en México (bayo, flor de mayo, mayocoba, negro Jamapa y pinto) y de sus productos de procesamiento después de tres tratamientos térmicos diferentes: en agua hirviendo (receta tradicional mexicana), al vapor a presión atmosférica y a presión controlada, para determinar la relación existente entre los compuestos fenólicos totales y las distintas actividades antioxidantes. Los extractos crudos se obtuvieron por agitación constante con agua destilada en tubos protegidos de la luz. El contenido de compuestos fenólicos totales se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu y se encontraron en un intervalo de 17.6 a 35 mg/g en el frijol crudo. El método a presión controlada mostró 63.7% de retención de compuestos fenólicos, los métodos de cocción al vapor y en agua hirviendo a presión atmosférica retuvieron 46.4% y 33.3%, respectivamente. Una baja cantidad de compuestos fenólicos se observó en el agua de remojo y los caldos de cocción (0.8 a 5.5 mg/mL). La actividad antioxidante se determinó mediante espectrofotometría, la correlación que existe entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante es de $r^2=0.97$ para el radical $ABTS^{\cdot+}$ y $r^2=0.90$ para el ensayo con el radical $DPPH^{\cdot-}$. Los resultados indican que el procesamiento térmico disminuye el contenido de compuestos fenólicos totales y las actividades antioxidantes se encontraron en un intervalo de 36.8% a 77.6% contra el radical $ABTS^{\cdot+}$ y de 19.5% a 44.2% contra el radical $DPPH^{\cdot-}$.

EFFECTO DEL PROCESAMIENTO EN EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DE DIFERENTES VARIETADES DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.) MEXICANO.

Introducción	5
1. MARCO TEÓRICO	7
1.1. GENERALIDADES DEL FRIJOL	8
1.1.1. Historia del origen del frijol.....	8
1.1.2. Clasificación taxonómica.....	9
1.1.3. Variedades y clasificación.....	9
1.1.4. Producción, rendimiento, consumo y disponibilidad de frijol.....	10
1.1.5. Composición química del frijol.....	11
1.1.6. Compuestos fenólicos presentes en el grano de frijol.....	15
1.1.7. Formas de consumo del frijol.....	16
1.2. COMPUESTOS FENÓLICOS	19
1.2.1. Generalidades y clasificación de los compuestos fenólicos.....	19
1.2.2. Flavonoides	23
1.2.3. Propiedades de los compuestos fenólicos	28
1.2.4. Compuestos fenólicos presentes en la dieta	30
1.2.5. Métodos para determinación de compuestos fenólicos	32
1.3. ANTIOXIDANTES.....	33
1.3.1. Definición de antioxidante y su clasificación	33
1.3.2. Determinación de la actividad antioxidante.....	35
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	38
2.1. Objetivo general.....	39
2.2. Objetivos específicos.....	39
2.3. Hipótesis	40
3. MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1. Reactivos	42
3.2. Obtención de las distintas variedades de frijol.....	42
3.3. Muestras no procesadas	42

3.3.1.	Frijol crudo	42
3.3.2.	Agua de remojo.....	43
3.4.	Procesamiento térmico de las diferentes variedades de frijol	43
3.4.1.	Cocción en agua hirviendo.....	43
3.4.2.	Cocción al vapor	43
3.4.3.	Cocción en agua hirviendo a presión controlada (15 lb).....	43
3.5.	Obtención de extractos crudos.....	44
3.6.	Determinación de compuestos fenólicos totales	44
3.7.	Determinación de la actividad antioxidante	44
3.7.1.	ABTS ^{•+} . 2-2'-Azino-bis (3-etilenbenzotiazonilo-6-ácido sulfónico)	44
3.7.2.	DPPH [•] (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)	45
3.8.	Análisis estadístico.....	45
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
4.1.	Procesamiento de las muestras	47
4.2.	Compuestos fenólicos totales.....	51
4.3.	Actividad antioxidante	60
5.	CONCLUSIONES.....	69
6.	PERSPECTIVAS Y SUGERENCIAS	71
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	73
8.	ANEXOS.....	78
	ANEXO A.....	79
	Curva de calibración para la determinación de compuestos fenólicos totales	79
	ANEXO B.....	81
	Determinación de actividad antioxidante por el método de ABTS	81
	ANEXO C.....	83
	ANOVA de comparación de medias (Compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante) de cada variedad de frijol	83

Introducción

El aumento en el consumo de frutas y verduras se asocia con una disminución del riesgo de padecer enfermedades degenerativas. Numerosos compuestos con capacidad antioxidante como carotenoides, ácido ascórbico, tocoferoles y compuestos fenólicos, principalmente flavonoides y ácidos fenólicos se encuentran en frutas y vegetales.

En recientes años el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) incluyendo a las variedades coloridas como pinto y negro han despertado un creciente interés debido a la presencia de compuestos que confieren pigmentación, los cuales poseen propiedades promotoras de la salud relacionadas con la prevención de enfermedades crónicas incluyendo algunos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, obesidad y diabetes. Científicos pertenecientes al departamento de Agricultura de los Estados Unidos determinaron los niveles de capacidades antioxidantes de más de 100 alimentos procesados, encontrando que tres variedades distintas de frijol común entre ellos la variedad pinto, ocupó la cuarta posición en la lista de los 10 alimentos con mayor capacidad antioxidante basados en una porción.

Evidencia clínica y experimental ha mostrado que los radicales libres son esenciales en la fisiología normal del ser humano, pero también aceleran el proceso de envejecimiento y son mediadores de la degeneración celular en diferentes etapas de algunas enfermedades. Los radicales libres y/o sus productos de descomposición, tienen una acción de deterioro sobre los sistemas biológicos incluyendo la fragmentación del ADN, nitrosación de tioles, inhibición de enzimas que mantienen la integridad genética y daño celular viéndose implicado en condiciones patológicas como enfermedad de Alzheimer y Parkinson, arterosclerosis, cáncer y diabetes.

El frijol común tiene sus orígenes en América Latina, y México desde la época precolombina basó su alimentación en el consumo de maíz como fuente de carbohidratos y frijol como fuente de proteína. Actualmente el frijol conserva un papel importante en la dieta de los mexicanos. Estudios recientes han comprobado la presencia de compuestos fenólicos en el grano de frijol, sin embargo, poco se sabe acerca del efecto que tienen los métodos de procesamiento térmico que sufre el frijol y que lo hacen comestible.

La identificación de componentes de los alimentos que puedan disminuir o inhibir el potencial efecto tóxico de radicales libres podrá proveernos una base para mejorar la salud humana a través de la dieta.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. GENERALIDADES DEL FRIJOL

1.1.1. Historia del origen del frijol

El frijol es de origen americano. Los restos más antiguos de esta planta, ya domesticada se encuentran en las cuevas de Coxcatlán, en el valle de Tehuacán, Puebla y datan de hace 4975 años AC. Debido a la gran variedad arqueológica de *Phaseolus vulgaris* y tal vez a su grado de endemismo, se ha sugerido una domesticación múltiple dentro de Mesoamérica a partir de una especie ancestral, la cual era polimórfica y estaba ampliamente distribuida. La planta de frijol más antigua encontrada en Perú data de hace unos 2200 años; debido a esto se cree que el frijol fue introducido a las costas de Perú por América Central (Téllez-Guzmán, 2003).

Durante la época precolombina es tal la importancia adquirida del frijol, que la civilización azteca lo incluyó en la lista de artículos que debían cobrarse como tributo que era un permiso que se exigía por el aprovechamiento de los recursos naturales o sitios en los que se establecían y habitaban las poblaciones de menor poderío. México, como parte de Mesoamérica, es considerado como uno de los centros de origen más importantes del mundo de varios tipos de frijol del género *Phaseolus*, entre ellos el que más destaca por su valor comercial es *Phaseolus vulgaris*. Existen antecedentes de que esta planta se viene cultivando desde hace aproximadamente 8 mil años. La gran diversidad de climas y nichos ecológicos, así como culturales de nuestro país, llevó durante este gran período de la historia a que se desarrollaran una gran diversidad de tipos de frijoles: negros, azulados, flores, bayos, pintos, ayacotes, espolón, ibes, cambas, y muchos otros más, lo cual constituye un mercado muy variado en cuanto a preferencias y precios (Reyes-Rivas y col., 2008).

La llegada de los españoles a nuestro continente, permitió que esta leguminosa se introdujera al viejo mundo a comienzos del siglo XVI, años después el producto es distribuido por comerciantes portugueses en la región de África Oriental, a partir de donde los árabes, que mercadeaban con los esclavos, se encargaron de diseminarlos a todo el territorio africano (Voyses-Voysest, 2000).

Hay quien estima que la rápida difusión del frijol en Europa tiene como elementos principales su gran capacidad de adaptarse a diversos climas (húmedos y fríos) y la aceptación, como fuente alimenticia, que tiene incluso entre la nobleza.

De esta manera se difundió a todo el mundo, de tal forma que hoy se ubican a los principales países productores en diversas zonas del planeta: India, China, Brasil, EE.UU., etc. (González y Pedraza, 2005).

1.1.2. Clasificación taxonómica

El género *Phaseolus* se clasifica dentro de la familia *Leguminosae*, subfamilia *Papilionoidae*, tribu *Phaseolae* y subtribu *Phaseolinae*. Es una planta herbácea autógama de ciclo anual, que se cultiva en zonas tropicales y regiones templadas, ésta característica permite agruparla en las denominadas especies termófilas, dado que no soporta bajas temperaturas. Se distingue por ser altamente poliforme, ya que de acuerdo con el agroecológico donde se desarrolla es posible distinguir variaciones fenológicas entre la misma especie de una región a otra (Reyes-Rivas y col., 2008).

1.1.3. Variedades y clasificación

Las variedades del frijol se pueden clasificar de acuerdo a diversos criterios. Por su consumo como grano seco y como grano y vaina verde; desde el punto de vista agronómico se utilizan características como la duración del período vegetativo y se habla de variedades precoces o tardías; en cuanto a la reacción al fotoperíodo se dice de variedades sensibles, insensibles o neutras y en lo que respecta a factores limitantes de la producción se ubica a las variedades en al menos las resistentes y susceptibles. Aunque a nivel mundial todas las variedades de frijol quedan incluidas en los criterios anteriormente señalados, a nivel práctico, los países en particular clasifican a sus variedades de frijol de acuerdo a las características del grano, en especial a lo relativo a su tamaño y color (Ulloa y col., 2011).

Se considera que México es el país que diversificó en gran medida el frijol encontrándose una amplia variedad de ellos dentro del territorio nacional, sin embargo resaltan por su importancia económica y su valor comercial cinco variedades de mayor demanda: negro, pinto, flor de mayo y flor junio, mayocoba y

bayo (Figura 1). Rodríguez-Licea y col. (2010) reportan que el 35.8% prefiere el frijol negro; 26.6% prefiere claros destacando mayocoba, flor de mayo y flor de junio; y 14.8% prefiere pinto nacional e importado.



Figura 1. Variedades de frijol mexicano. a) Bayo; b) Flor de Mayo; c) Mayocoba; d) Negro Jamapa; e) Pinto

1.1.4. Producción, rendimiento, consumo y disponibilidad de frijol

Actualmente, el papel de esta leguminosa sigue siendo fundamental en lo económico, porque representa para la economía campesina una fuente importante de ocupación e ingreso, así como una garantía de seguridad alimentaria vía autoconsumo; mientras que en la dieta representa, la principal y única fuente de proteínas para algunas capas de la población mexicana. Se considera que alrededor de 570,000 productores primarios se dedican a este cultivo siendo la segunda actividad en importancia después del maíz, por otra parte, como generador de empleo es un factor importante en la economía del sector primario.

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es entre las leguminosas de grano, la especie más importante para el consumo humano. América Latina es en particular, la zona de mayor consumo y producción, estimándose que el 30% de la producción total mundial proviene de esta área (Voysesst-Voysest, 2000).

Si bien el frijol es importante en la dieta de la mayoría de los países en desarrollo, por el contrario, es menos importante en las dietas occidentales. El consumo diario per cápita de todos los productos de soya en Asia sólo es de 110 g en comparación con aproximadamente 9 Kg en los Estados Unidos y 18 Kg per cápita en México (González y Pedraza, 2005; SAGARPA, 2008).

Entre los países productores de ésta leguminosa destacan por orden de importancia India con 18.49%, Brasil con 16.55%, China con 11.47%, Estados Unidos con 6.84%, y México en quinto lugar con un 6.80%. Estas naciones, junto con Myanmar, contribuyeron con el 63.86% del total producido. El mayor consumo de frijol en el mundo se manifiesta en regiones con estándares de vida bajos, principalmente en naciones en vías de desarrollo, dado los niveles de aceptación y uso de este producto se hace referencia a América Latina y África. Según la FAO (2008), de los trece países de mayor consumo de frijol en el mundo, ocho de ellos se encuentran en América Latina: Nicaragua, Brasil, México, Paraguay, Belice, Costa Rica, Guatemala y Honduras, lo que confirma la relación entre los niveles de consumo y los ingresos per cápita de países menos y más desarrollados (Reyes-Rivas y col., 2008).

1.1.5. Composición química del frijol

El grano de frijol contiene 22% de proteínas de alta digestibilidad, es un alimento de alto valor energético, contiene alrededor de 70% de carbohidratos totales y además aporta cantidades importantes de minerales (Ca, Mg, Fe), Vitamina A, Tiamina, Riboflavina y ácido ascórbico. El frijol contiene metabolitos secundarios como taninos, flavonoides, ácidos fenólicos y fibra, entre otros (De Mejía y col., 2003).

El grano de frijol consiste en tres partes diferentes: el cotiledón, la capa de la semilla o testa y el embrión (germen), estos representan el 89%, 10% y 1% respectivamente del total del peso (Duenas y col., 2006).

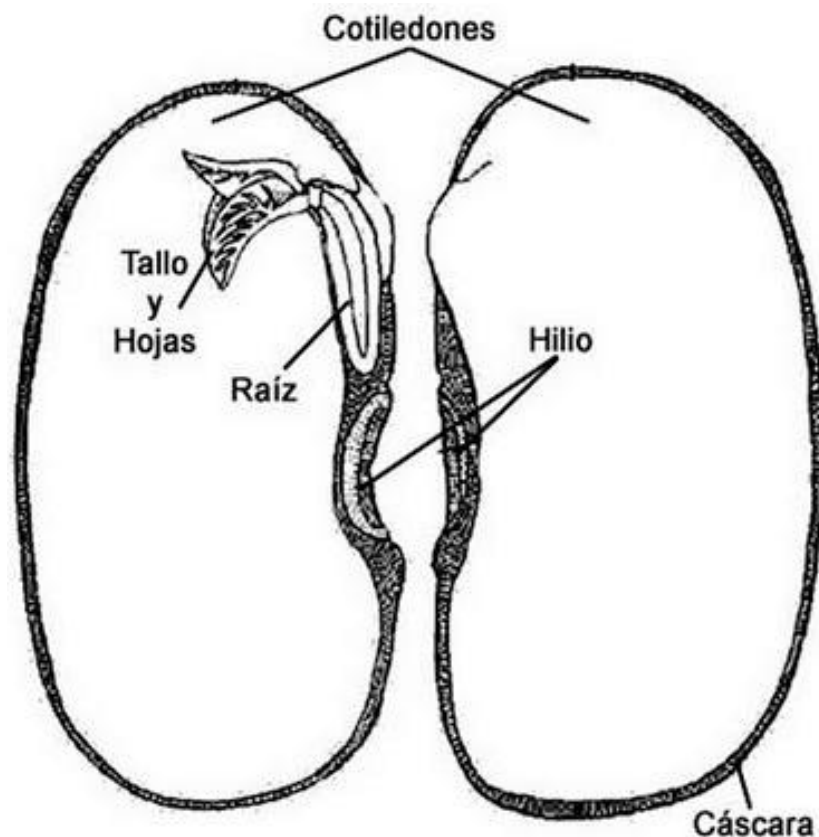


Figura 2. Estructura del grano de frijol (Voyses-Voyses, 2000)

Composición de proteínas. El frijol es una buena fuente de aminoácidos aromáticos como lisina, leucina e isoleucina. Sin embargo, es deficiente en aminoácidos azufrados (metionina y cisteína), valina, triptófano y treonina. La digestibilidad aparente de los frijoles cocidos es de 68.8%. La valina es el aminoácido menos disponible, mientras que la lisina es el más disponible. No obstante el tratamiento térmico excesivo puede disminuir la disponibilidad de algunos aminoácidos.

Composición de carbohidratos. Los carbohidratos son los componentes mayoritarios del frijol. La mayor parte son carbohidratos complejos, almidón y fibra dietética, mientras que la fracción de azúcares (mono, di y oligosacáridos) es significativamente menor (Tobar, 1992).

Composición de grasas. Aunque el contenido de grasa del frijol es bajo, tiene un alto porcentaje de fosfolípidos (25-35% del contenido total de grasa). El ácido linolénico es el ácido graso más abundante (Matthews, 1990).

Composición de micronutrientes. El contenido de hierro es alto (4.82%), aunque tiene una biodisponibilidad muy baja (0.8%), posiblemente debido a la presencia de otros componentes no nutritivos presentes en los frijoles.

Tabla 1. Composición nutricional del frijol. Aporte de una ración diaria de (70.5 g)

		Contribución de la ración diaria de frijol a la IDR (%)
Energía	345 kcal	8.34
Humedad	10.6 g	-
Proteína	21.8 g	25.4
Grasa	14 g	-
Carbohidratos	63.5 g	-
Tiamina	0.99 mg	40.4
Rivoflavina	0.201 mg	7.5
Niacina	1.93 mg	4.9
Vitamina C	0.285 mg	8.8
Ácido fólico	0.447 mg	134.4
Fósforo	380.3 mg	28
Potasio	1424.3 mg	34.6
Sodio	5.2 mg	0.3
Calcio	92.3 mg	5.6
Magnesio	195.6 mg	35.5
Zinc	3.96 mg	15.9
Cobre	0.77 mg	27.5
Hierro	4.82 mg	19.1

*Tabla adaptada al IDR en México (Serrano y Goñi, 2004)

1.1.5.1. Compuestos bioactivos presentes en el frijol

Entre los compuestos no nutritivos del frijol se pueden mencionar los inhibidores de las enzimas tripsina y α -amilasa, fitatos, oxalatos, compuestos fenólicos y saponinas entre otros. Muchos de ellos se han identificado debido a los efectos adversos que producen, sin embargo, últimamente se cree que a dosis controladas podrían ejercer efectos benéficos en la salud y en este sentido se han clasificado como compuestos bioactivos. Los inhibidores de proteasas han sido asociados con cáncer pancreático, en estudios con animales, aunque se ha observado que pueden actuar como agentes anticancerígenos. Estudios con animales, cultivos celulares *in vitro* y datos epidemiológicos, muestran bajas tasas de mortalidad por cáncer en poblaciones humanas con alta ingesta de inhibidores de proteasas. Se ha observado *in vitro*, que los inhibidores de proteasa pueden suprimir la transformación maligna de la células inducidas por diferentes tipos de agentes cancerígenos (Clemente y Domony, 2001).

Con relación a los inhibidores de amilasa, se ha observado que pueden causar hipertrofia pancreática. Sin embargo, también se ha comprobado que pueden reducir la digestibilidad de almidón, y por lo tanto reducir los niveles de glucosa sanguínea y aumentar los niveles de insulina en personas y ratas (Clemente y Domony, 2001). El consumo de frijol reduce los niveles de glucosa plasmática postprandial, insulina, péptido C y péptido inhibidor gástrico, lo que sugiere que podría ser utilizado con propósitos terapéuticos en diabetes y control de obesidad (Serrano y Goñi, 2004).

Las fitohemaglutininas son proteínas termolábiles resistentes a la hidrólisis enzimática que tienen capacidad para unirse a carbohidratos. El consumo de fitohemaglutininas se asocia a toxicidad, debido a su efecto aglutinante de glóbulos rojos, sin embargo al ser termolábiles se destruyen con la cocción. El ácido fítico debido a su alta reactividad con metales especialmente con zinc, calcio y hierro, forma complejos insolubles que hacen disminuir la biodisponibilidad de estos minerales en el intestino. No obstante, la habilidad del ácido fítico para quelar minerales, también puede ejercer efectos protectores relacionados con el

riesgo de cáncer de colon y la disminución en el colesterol y triglicéridos séricos en animales experimentales. Su mecanismo de acción parece estar relacionado con su poder antioxidante, que reduce la proliferación celular y aumenta la respuesta inmune (Serrano y Goñi, 2004).

Los taninos condensados han sido asociados a la baja disponibilidad de la proteína. Aunque muchos autores lo asocian como factores antinutricionales debido a sus efectos adversos en las enzimas digestivas, se considera que las propiedades antioxidantes que presentan pueden tener efectos benéficos en la salud (Serrano y Goñi, 2004).

1.1.6. Compuestos fenólicos presentes en el grano de frijol

Los flavonoides naturales presentes en los frijoles fueron aislados por primera vez en 1960 por Feenstra que trataba de determinar la relación entre los genes y las síntesis del pigmento en frijoles, aislando 18 compuestos coloridos diferentes. Los compuestos coloridos se identificaron como antocianinas, glucósidos flavonoides y leucoantocianidinas. Numerosos estudios han demostrado también que el color de la testa de la semilla del frijol se debe a la presencia de flavonoles, así como otros compuestos fenólicos, antocianinas y taninos. Los compuestos fenólicos no están distribuidos uniformemente en las plantas. A nivel de tejido, las capas externas de las plantas o los alimentos de origen vegetal contienen mayores niveles de compuestos fenólicos que los situados en las partes interiores (Naczka y Shahidi, 2004). Los flavonoides en particular se concentran principalmente en la testa de la semilla.

Existen estudios *in vivo* sobre el efecto de los compuestos fenólicos del frijol sobre la salud y se sabe que los compuestos fenólicos de cuatro variedades de frijol mexicano de mayor demanda actúan como antioxidantes e inhiben el crecimiento de las células cancerosas (Reynoso y col., 2007).

Los compuestos fenólicos primarios en frijol y en sus testas son principalmente ácidos fenólicos como ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico y ésteres del ácido sinápico. Recientemente, clases comerciales de frijol han sido diferenciadas por la presencia de tres antocianinas (delfinidina, petunidina y malvidina) en frijol negro,

kaempferol en frijol pinto y quercetina y kaempferol en frijoles rosados, mientras que no se detectaron flavonoides en frijoles de testa blanca (Luthria y Pastor, 2006; Ros y col., 2009).

Martínez-Preciado y col. (2004) determinaron que el frijol negro posee 3 compuestos fenólicos mayoritarios: delphinidina (47%), petunidina (22%) y malvidina (15%), todos glucosidados. Para la variedad mayocoba se identificó un solo compuesto mayoritario, el kaempferol. Para el caso de los ácidos fenólicos, se han identificado tanto en frijol crudo como en frijol procesado, el ácido gálico, catequina, ácido p-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido ferúlico y ácido cumárico.

1.1.7. Formas de consumo del frijol

En alimentación humana, las leguminosas se someten a una serie de procesos tecnológicos y/o culinarios que mejoran su valor nutricional. Un buen procesado es probablemente más importante en las legumbres que en cualquier otro alimento, debido a la posibilidad de eliminar componentes no deseables presentes en estos alimentos crudos, el procesamiento térmico y preparación de las leguminosas además de mejorar la textura, la palatabilidad y el valor nutritivo debido a la gelatinización del almidón y desnaturalización de proteínas, incrementa la biodisponibilidad de algunos nutrientes además de inactivar compuestos tóxicos lábiles al calor e inhibir enzimas (Bakr, 1991).

Los métodos de preparación varían en función de las regiones y culturas. En México es común el remojo de los frijoles en agua fría una noche previa a la cocción, el remojo se realiza a temperatura ambiente, ablanda el grano, reduce el tiempo de cocción y reduce la concentración de algunas sustancias no nutritivas que se solubilizan en el medio. Por otro lado, este proceso culinario aumenta las actividades de tripsina y α -amilasa como consecuencia de un aumento de la permeabilidad en la pared de las semillas, ya que los inhibidores de estas actividades enzimáticas son solubles en agua (Abd y Habiba, 2003). También se solubilizan minerales, por lo que en parte disminuye el aporte nutricional de micronutrientes.

En promedio, el tiempo necesario para alcanzar el 90% de la cocción se reduce cerca del 40% y el tiempo para alcanzar el 100% de cocción se reduce en un 20%. El efecto del remojo es de conocimiento público desde hace mucho tiempo y tiene una aplicación práctica, ya que el ama de casa puede disminuir el tiempo de cocción de los frijoles, contribuyendo al ahorro de energía y combustible requeridos para la elaboración de los alimentos (Mederos, 2006).

Los frijoles son cocinados antes de ser consumidos, colocándolos en agua hirviendo a presión ambiente (receta tradicional mexicana) o a presión controlada, o bien al vapor.

Numerosos métodos de procesamiento y cocción posiblemente reducen antinutrientes presentes en los frijoles tales como inhibidores de tripsina y ácido fítico. Investigaciones sobre la cocción y retención de componentes bioactivos muestran que una dieta saludable puede contener una adecuada cantidad de antioxidantes, sin embargo, la forma de preparación de los alimentos puede ser tan importante como el alimento en sí (Boateng y col., 2007).

Cuando los frijoles están en contacto con agua caliente o fría, puede existir cierta lixiviación (especialmente de los nutrientes solubles en agua) de vitaminas y minerales de las leguminosas hacia el agua. El análisis proximal del caldo de frijol contiene en promedio 6.96% a 10.65% de carbohidratos y 1.2% a 2.1% de proteínas. El calor destruye algunos compuestos termolábiles tales como inhibidores de proteasas, hemaglutininas, etc., desnaturaliza proteínas e incluso produce un cierto grado de hidrólisis, todo lo cual conduce a una predigestión proteica que facilita la digestión posterior del alimento. No obstante, un tratamiento térmico prolongado hace disminuir el valor nutritivo de la proteína, ya que destruye aminoácidos esenciales como lisina y cisteína (Serrano y Goñi, 2004). Después de la cocción se consume tanto el grano entero como el caldo, es de destacar la importancia de este caldo para la alimentación de los niños, puesto que para muchos de ellos pertenecientes a la base de la pirámide económica, es el primer alimento que toman después de la lactancia materna y antes de que puedan masticar (Pérez-Herrera, 2002).

Efecto del almacenamiento. La velocidad e intensidad en el deterioro gradual, irreversible y acumulativo del grano que ocurre durante su almacenamiento dependerá del tiempo, la temperatura del almacenamiento, las características intrínsecas del grano y principalmente de la humedad de éste. Se ha encontrado que los frijoles pueden ser almacenados durante cinco meses a 25°C y 15.4% de humedad, sin que se detecten problemas de endurecimiento. También se conoce que durante el almacenamiento ocurre un aumento en el obscurecimiento del grano. Existe un incremento en la actividad de la enzima peroxidasa durante el período de almacenamiento y una diferencia en su expresión, relacionado con el momento de cosecha anticipada y normal del grano, siendo mayor en el almacenamiento con la colecta anticipada; así mismo el mayor obscurecimiento de la testa durante el almacenamiento podría estar relacionado con la oxidación de los compuestos fenólicos por la peroxidasa (Mederos, 2006).

1.2. COMPUESTOS FENÓLICOS

1.2.1. Generalidades y clasificación de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos constituyen una amplia gama de sustancias químicas, con diferentes estructuras, propiedades químicas y actividad biológica, englobando más de 8000 compuestos distintos. Químicamente, son sustancias que poseen un anillo aromático, con uno o más grupos hidroxilo. Los compuestos fenólicos es el grupo más numeroso y ampliamente distribuido en la naturaleza.

Además de su comprobada actividad antioxidante, se les ha atribuido una gran diversidad de efectos terapéuticos, tales como actividades cardiotónica, antiinflamatoria, hepatoprotectora, antineoplástica, antimicrobial, etc. (Narayama y col.,2001). Los compuestos fenólicos se pueden clasificar de acuerdo con el esquema de la Figura 3.

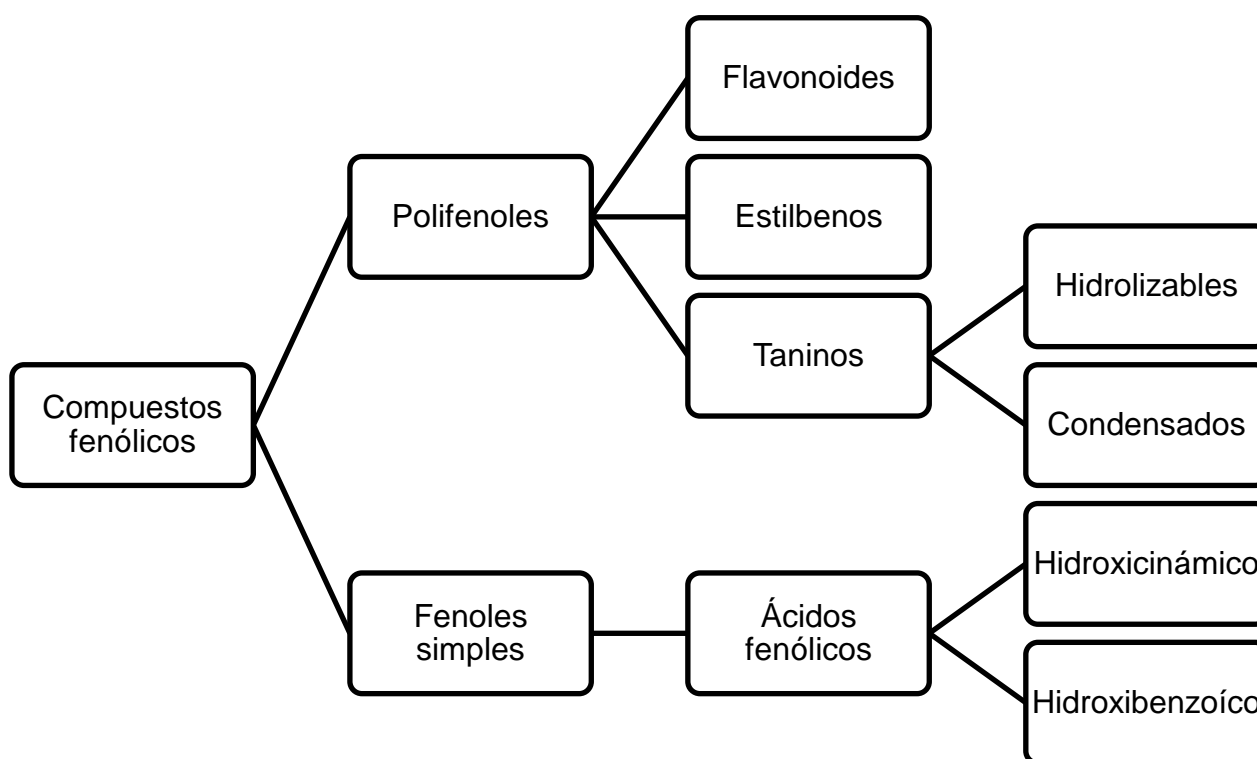


Figura 3. Clasificación de los compuestos fenólicos (Leopodini, 2011)

Se clasifican en polifenoles y fenoles simples basándose en el número de subunidades de fenol. Los polifenoles poseen al menos dos subunidades de fenol. Mientras los ácidos fenólicos tienen un ácido carboxílico como grupo funcional y dos carbonos que distinguen sus estructuras: hidroxicinámico e hidroxibenzoico. Los ácidos hidroxicinámicos son más comunes y consisten principalmente en ácido *p*-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico y ácido sinápico.

El ácido hidroxibenzoico más común es el ácido salicílico (2-hidroxibenzoato), seguido del ácido gálico (Figura 4a) y el ácido elágico (Figura 4b), que son metabolitos comunes de las plantas. El ácido clorogénico es un éster del ácido caféico y el ácido quínico es el principal compuesto fenólico presente en manzanas rojas y peras (Pourmorad y col., 2006).

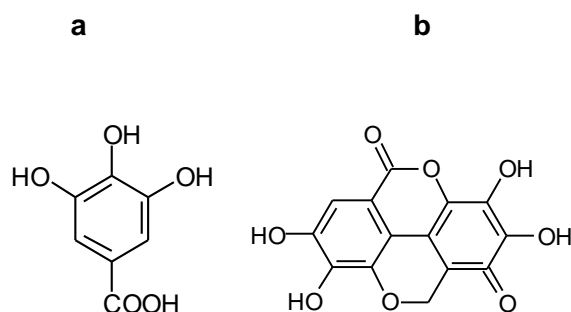


Figura 4. Estructuras de los ácidos hidroxibenzoicos más comunes. a) ácido gálico, b) ácido elágico

Los ácidos hidroxicinámicos más ampliamente distribuidos en los vegetales son el ácido *p*-cumárico (Figura 5a), el ácido caféico (Figura 5b) y el ácido sinápico (Figura 5c). Se encuentran comúnmente en forma conjugada con ésteres de hidroxiaácidos, como el ácido quínico, el ácido shiquímico y el ácido tartárico, así como con azúcares (Pourmorad y col., 2006).

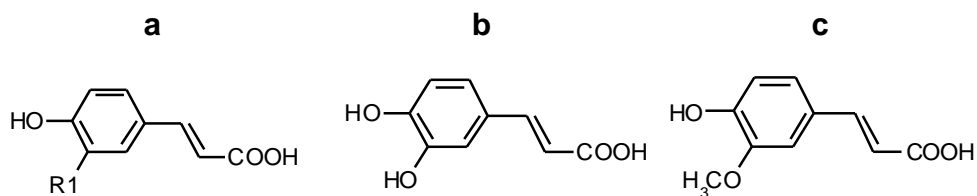
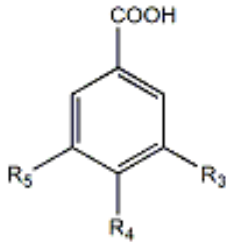
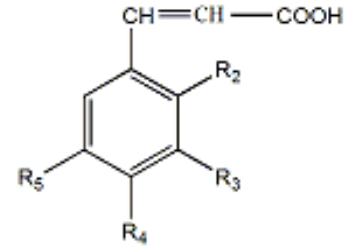


Figura 5. Estructuras de los ácidos hidroxicinámicos más comunes: a) ácido *p*-cumárico, b) ácido caféico, c) ácido sinápico

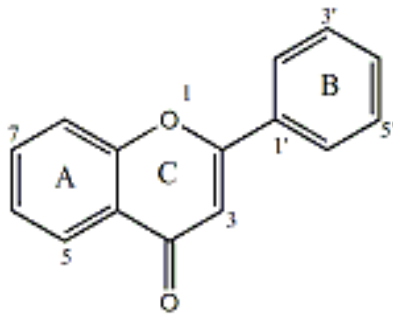
Dentro de la subdivisión de los polifenoles el grupo más importante es el de los flavonoides que consisten en un gran grupo de sustancias de bajo peso molecular, derivados de benzo- γ -pirano. La característica estructural básica es el núcleo flavano (2-fenil-benzo- γ -pirano), un sistema de dos anillos de benceno A y B, unidos por un oxígeno que contiene el anillo pirano C (Figura 6). Los flavonoides se pueden clasificar en subclases: flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavononas, antocianinas y proantocianidinas. La familia de los estilbenos incluye varios compuestos entre los que destacan el resveratrol, pterostilbeno y el piceatannol, caracterizados por un doble enlace de los anillos fenólicos. Los taninos, se dividen en dos grupos, condensados e hidrolizables. Los taninos condensados son polímeros de flavonoides y los hidrolizables contienen ácido gálico o compuestos similares, esterificados con un hidrato de carbono (Leopodini, 2011).



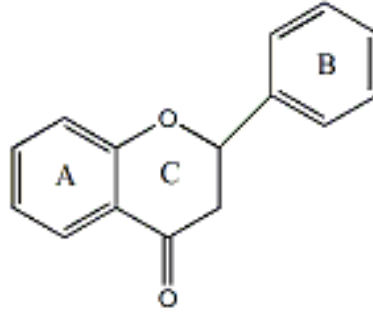
Derivados del ácido benzoico



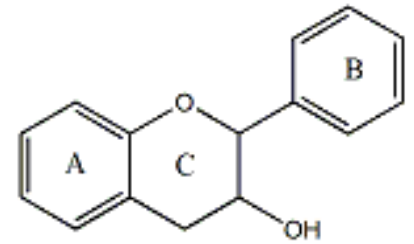
Derivados del ácido hidroxicinámico



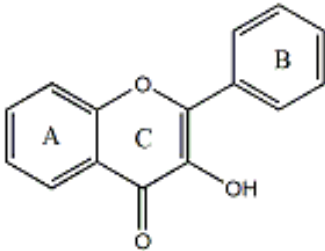
Flavona



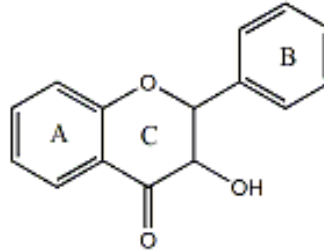
Flavanona



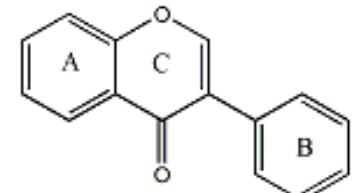
Flavanol



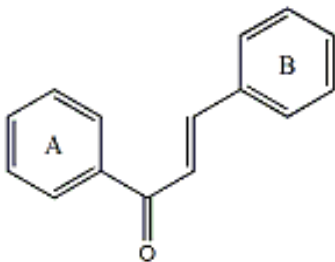
Flavonoles



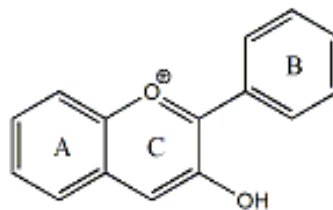
Flavanonol



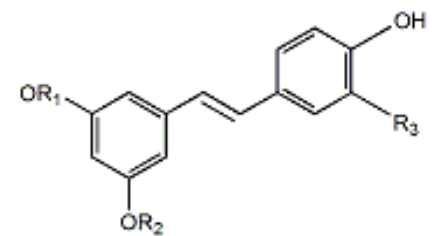
Isoflavona



Chalconas



Antocianidinas



Estilbenos

Figura 6. Estructura de los ácidos fenólicos, flavonoides y estilbenos

1.2.2. Flavonoides

Los flavonoides fueron descubiertos por Szent-György, quien en 1930 aisló de la cáscara de limón la citrina, que regulaba la permeabilidad de los capilares.

Las propiedades físicas dependen de la clase de flavonoide considerado y su forma (libre o glicosilado). Por ejemplo las flavonas, flavonoles y auronas, debido al sistema conjugado son compuestos sólidos con colores que comprenden desde el amarillo muy tenue hasta el rojo. Las antocianidinas son de colores rojo intenso, morado, violeta y azul. Las flavanonas y flavanoles debido al carbono quiral C-2 presentan el fenómeno de la rotación óptica. Los glicósidos son en general sólidos amorfos, mientras que las agliconas y los altamente metoxilados son cristalinos.

La solubilidad depende de la forma en que se encuentren y el número y clase de sustituyentes presentes. Las antocianinas son solubles en agua y alcohol. Las agliconas flavonoides altamente hidroxiladas son solubles en alcohol (etanol, metanol y n-butanol), mientras que las poco hidroxiladas lo son en disolventes como éter etílico, acetato de etilo y acetona. Las agliconas flavonoides altamente metoxiladas son solubles en disolventes menos polares como el éter de petróleo y el cloroformo.

Los flavonoides con hidroxilos fenólicos son solubles en disoluciones alcalinas, pero algunos altamente hidroxilados se descomponen por acción de las bases fuertes, un hecho que permite reconocerlos y diferenciarlos de otros, y que hace años se utilizó para su elucidación estructural.

Los glicósidos flavonoides son sólidos amorfos que se funden con descomposición, mientras que las correspondientes agliconas son sólidos cristalinos (Martínez-Flores y col., 2002).

1.2.2.1. Relación estructura-actividad

La relación estructura-actividad influye decididamente sobre la actividad biológica de los flavonoides. El número y la posición de grupos hidroxilo, la glicosilación y otras sustituciones determinan la actividad antioxidante de los flavonoides.

Las disposiciones estructurales que imparten la mayor actividad antioxidante son la sustitución 3' 4' orto dihidroxi en el anillo B, las disposiciones en posición meta en los carbonos 5 y 7, el doble enlace entre los carbonos 2 y en combinación con los grupos 4 ceto y 3 hidroxilo (Figura 7). Sin embargo la sustitución de grupos hidroxilo por glicosilación disminuye la actividad antioxidante. Los grupos *orto*-dihidroxi estructuralmente son los más importantes por presentar una alta actividad (Cai y col., 2006), por otro lado se ha examinado el efecto de los elementos estructurales del anillo C sobre los radicales libres, que resalta la actividad de estos compuestos (Tsimogiannis y Oreopoulou, 2006). Es de suma importancia comprobar la capacidad de estos compuestos para quelar metales de transición.

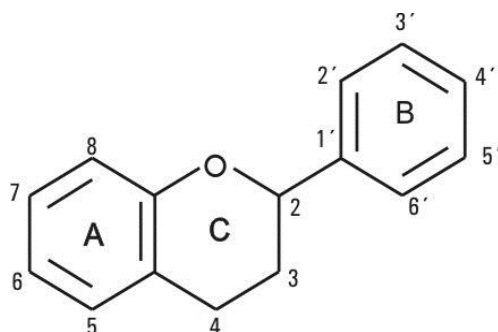


Figura 7. Estructura básica de los flavonoides

1.2.2.2. Síntesis, absorción y metabolismo

Los compuestos fenólicos se sintetizan en las plantas y participan en la fase dependiente de la luz de la fotosíntesis, durante la cual se cataliza el transporte de electrones. Su formación tiene lugar a partir de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina. Estos compuestos fenólicos juegan un rol vital en las plantas y regulan el metabolismo y síntesis de la lignina. La fenilalanina y la tirosina dan lugar al ácido cinámico y al ácido *p*-hidroxicinámico que al condensarse con acetato, originan la estructura básica de los flavonoides (Figura 7). Posteriormente se forman los derivados glicosilados o sulfatados.

Sobre la biodisponibilidad, absorción y metabolismo poco se conoce, pero es sabido que los diferentes grupos de los compuestos fenólicos poseen distintas propiedades farmacocinéticas. Los compuestos solubles son metabolizados en el

tracto gastrointestinal. Las agliconas libres como la quercetina, genisteína y compuestos simples como el ácido ferúlico, ácido cafeico y ácido p-cumárico son absorbidos a través de la mucosa del intestino delgado, determinado mediante ensayos experimentales en ratas. La transformación de los compuestos fenólicos tiene lugar en dos localizaciones: en primer lugar en el hígado por medio de reacciones de biotransformación de la fase I en las que se introducen o exponen grupos polares; en segundo lugar en el colon mediante reacciones de biotransformación de la fase II. La conjugación con el ácido glucorónico, sulfatos o glicina, parecen tener lugar tanto para los compuestos fenólicos como para sus metabolitos procedentes del colon. Los conjugados solubles en agua, pueden excretarse por la orina (Martínez-Flores y col., 2002).

La biodisponibilidad de los flavonoides no está aún bien establecida. Los escasos datos indican que solo una pequeña parte del compuesto es absorbido y como tal encontrado en plasma y orina. Los porcentajes de flavonoides recuperados en orina están entre el 7% y el 25% del compuesto ingerido. En el plasma humano las concentraciones encontradas después de la ingesta son del orden de 1 μM y decrecen rápidamente (Scalbert y Williamson, 2000).

La mayoría de los polifenoles son probablemente demasiado hidrofílicos para penetrar la pared intestinal por difusión pasiva. El transporte activo que se conoce es dependiente de Na^+ . Las características de absorción están determinadas por la estructura del flavonoide (Ader y col., 1996).

El colon tiene potencial catalítico e hidrolítico, realizando rápidamente reacciones de desconjugación y liberando a las agliconas. Algunas bacterias hidrolizan estas agliconas hacia compuestos más sencillos como ácidos fenilacéticos y fenilpropiónicos que pueden ser absorbidos. Estos metabolitos pueden retener parte de la capacidad reductora de sus predecesores pues conservan grupos fenólicos libres (Ader y col., 1996). En general, la biodisponibilidad de los flavonoides es relativamente baja debido a la absorción limitada y rápida eliminación. Más aún, los flavonoides son rápida y extensamente metabolizados y las actividades biológicas de sus metabolitos no son siempre las mismas que las de sus predecesores (Scalbert y Williamson, 2000).

1.2.2.3. Antocianinas

Las antocianinas (del griego *anthos* flor y *kyanos* azul), son el grupo más importante de pigmentos solubles en agua visibles para el ojo humano (Harbone, 1976). Las antocianinas forman parte de la familia de los polifenoles, y la subfamilia flavonoides. Los colores rosa, rojo, azul, malva y violeta de las flores, frutas y verduras se deben a la presencia de estos pigmentos.

Las antocianinas son flavonoides, es decir, sustancias derivadas del núcleo flavano, con un anillo A benzoil y un anillo B hidroxicinamoil (Figura 8). Al igual que otras sustancias polifenólicas, se encuentran en la naturaleza en forma de glicósidos, siendo conocidas sus agliconas como antocianidinas, a las cuales se les une un azúcar por medio de un enlace β -glicosídico.

Las clases comunes de glucósidos son: 3-monósido, 3-biósido y 3-triósido, así como también 3,5-diglicósido y más raramente el 3,7-diglicósido con glucosa, galactosa, arabinosa y xilosa. Las antocianinas poseen uniones de azúcar en el anillo B 3' y 5'-hidroxilos. Los dos tipos más importantes de glucósidos son: el 3-monósido y el 3,4-diglicósido. Como regla el 3-hidroxil siempre tiene un azúcar, exceptuando 3-desoxipelargonidina, 3-desoxicianidina y 3-desoxidelfinidina (Cuevas-Montilla y col., 2003).

Además de la glucosilación, la introducción de moléculas aciladas es un efecto que ocurre ampliamente. Los grupos comunes de acilo son los ácidos aromáticos de los cuales los más comúnmente encontrados son ácidos hidroxicinámicos: ácido *p*-cumárico, ácido cafeico y ácido ferúlico, y más raramente el ácido hidroxibenzoico. El color particular de cada antocianina depende del número y orientación de los grupos hidroxilos y metoxilos. Un incremento en la hidroxilación produce un color azul, mientras un incremento en la metoxilación produce un color rojo. Todas las antocianinas son derivadas del catión flavilo básico. Se conocen más de 100, las diferencias entre ellas se debe al número de grupos hidroxilos, el grado de metoxilación de éstos grupos, así como la naturaleza y el número de los ácidos aromáticos y alifáticos presentes en la molécula.

De todas las antocianinas existentes, sólo seis son de interés en los alimentos: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina y malvidina (Figura 8), los restantes son menos frecuentes y se encuentran en algunas hojas (Cuevas-Montilla y col., 2003).

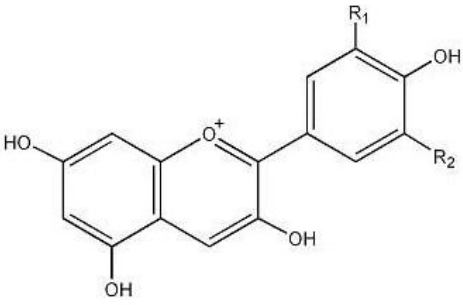
Estructura de las antocianinas	Aglicona	R ₁	R ₂
	Petunidina	OH	OCH ₃
	Malvidina	OCH ₃	OCH ₃
	Pelargonidina	H	H
	Delphinidina	OH	OH
	Cianidina	OH	H
	Peonidina	OCH ₃	H

Figura 8. Estructura y sustituyentes de las antocianinas (Rodríguez y Wrolstad, 2001)

Es común que en una misma antocianidina haya interacciones con más de una clase de carbohidrato para formar diferentes antocianinas; la pelargonidina es la que produce el color rojo de algunas flores y de las fresas; la delphinidina se encuentra en las berenjenas y la cianidina en col roja, higos, cerezas, ciruelas y otros frutos (Rodríguez y Wrolstad, 2001).

1.2.2.4. Flavonoles

Los flavonoles poseen un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo hidroxilo en posición 3 del anillo C (Figura 9). Los flavonoles más comunes son la quercetina y el kaempferol. En el frijol es abundante este último y se encuentra principalmente en variedades de testa clara como mayocoba y bayo.

Las fuentes alimenticias principales de los flavonoles son, entre otras, el té negro, las cebollas, las manzanas, la pimienta negra (que contiene cerca de 4 g/Kg de quercetina) y bebidas alcohólicas como vino y cerveza. (Martínez-Flores y col.,

2002). De los alimentos, el té es una de las fuentes principales de quercetina, principalmente en Japón y los Países Bajos, el vino tinto lo es en Italia y las cebollas en Estados Unidos y Grecia. La ingesta promedio de flavonoles se sitúa entre los 20 y 26 mg/día. Excede, por tanto, a la de otros antioxidantes en la dieta, tales como el β -caroteno (2-3 mg/día) y la vitamina E (7-10 mg/día) y es aproximadamente igual a un tercio de la vitamina C (70-100 mg/día). Los flavonoides representan una contribución importante al potencial antioxidante de la dieta humana (Martínez-Flores y col., 2002).

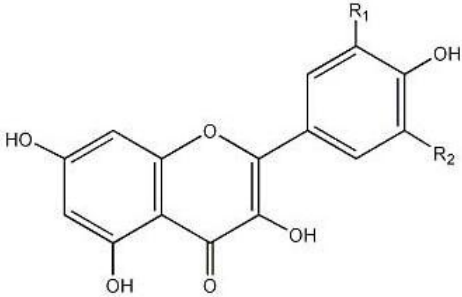
Estructura de los flavonoles	Aglicona	R ₁	R ₂
	Kaempferol	H	H
	Quercetina	OH	H
	Mirecitina	OH	OH
	Isoramnetina	OCH ₃	H

Figura 9. Estructura y sustituyentes de los flavonoles

1.2.3. Propiedades de los compuestos fenólicos

El efecto preventivo atribuido es amplio, existe un sinnúmero de investigaciones realizadas sobre las actividades fisiológicas de los componentes funcionales tanto de plantas como de animales. Además de que los componentes fenólicos son relevantes para la prevención de cánceres en etapas de iniciación, progresión y promoción.

Los compuestos fenólicos tienen una gran capacidad antioxidante, considerada la actividad biológica responsable del efecto preventivo sobre algunas enfermedades de origen cardiaco e inmunológico. La finalidad o mecanismo de estos compuestos reside en su capacidad para captar los radicales libres que se pueden generar en las células del cuerpo humano y que son resultado de la combinación de muchos factores. Dichos radicales actúan sobre ácidos grasos poliinsaturados,

colesterol, ADN y lípidos, siendo estos últimos los más susceptibles a la sustracción de un electrón por parte del radical que lo requiere para alcanzar su estabilidad electroquímica.

Como antioxidantes, los compuestos fenólicos pueden proteger a las células contra el daño oxidativo y por lo tanto limitar el riesgo de varias enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo causado por los radicales libres (Scalbert y Morand, 2005). El estrés oxidativo se define comúnmente como el desequilibrio entre las especies oxidantes y reductoras a nivel celular de un organismo (Miller y Brzezinska, 1999).

Los efectos preventivos de cáncer de los compuestos fenólicos han sido atribuidos a una variedad de mecanismos, incluyendo la actividad de la modulación enzimática que resulta en una disminución de carcinogénesis por xenobióticos (Moon y col., 2006).

Algunos compuestos fenólicos dificultan la absorción del promotor tumoral en el tubo digestivo, sin embargo muchos de los efectos anticancerígenos podrían ser el resultado de la modulación de las enzimas P450 de la fase I, así como la inducción de enzimas antioxidantes y enzimas detoxificadoras (Cancino y col., 2001). Por otro lado pueden intervenir en la metabolización de agentes mutagénicos interfiriendo en la actividad de las enzimas de fase II. Inhiben la activación de los carcinógenos pudiendo actuar capturando el mutágeno o interponiéndose entre éste y su diana de acción, siendo la genisteína y la quercetina los más estudiados *in vivo*. Producen inhibición de la actividad de oncogénesis inhibiendo su actividad.

Son en gran parte responsables de la inhibición de cánceres, las flavonas (crisina, baicaleína y galangina), las flavanonas (naringenina) e isoflavonas (genisteína, biochanina A) inhiben la actividad de la aromatasa (CYP19), disminuyendo la biosíntesis de estrógeno y produciendo efecto antiestrogénico (Cancino y col., 2001).

1.2.4. Compuestos fenólicos presentes en la dieta

Los compuestos fenólicos se encuentran en frutas, verduras, semillas y flores, los cuales deben ser consumidos en la dieta humana de forma habitual. Los antioxidantes de las plantas constituyen uno de los componentes bioactivos de los alimentos, cuya fuente principal se encuentra en las diferentes partes de la planta. Algunos recursos son el ajo, el brócoli, el té verde, la soya, el tomate, la zanahoria, la col de bruselas, la col rizada, la cebolla, la coliflor, el betabel, el cacao, los arándanos, la zarzamora, las uvas y los cítricos. En la tabla 2 se muestra el contenido de compuestos fenólicos expresados en función de ácido gálico por gramo de muestra seca (Muñoz y Ramos, 2007).

Muchos de estos compuestos actúan mejor en mezcla con diferente actividad por lo que los muy reactivos sean los que reduzcan a los radicales más activos mientras que los otros actúen regenerando a los primeros.

Aunque los hábitos alimenticios son muy diversos en el mundo, el valor medio de ingesta de compuestos fenólicos se estima como 23 mg/día (Martínez-Flores y col., 2002), siendo predominantes los flavonoides y más específicamente los flavonoles, especialmente la quercetina.

Tabla 2. Contenido de compuestos fenólicos totales presentes en 20 alimentos

Alimento	Nombre científico	Compuestos Fenólicos Totales (mg GAE/g materia seca)
Manzana	<i>Maluspumila</i>	11.9
Fresa	<i>Fragaria ananassa</i>	14.8
Cebolla	<i>Allium cepa</i>	2.5
Grosella negra	<i>Ribesnigrum</i>	20.3
Grosella roja	<i>Ribesnigrum</i>	12.6
Frambuesa	<i>Rubuschamaaemorus</i>	16.2
Cebolla morada	<i>Allium cepa</i>	3.0
Tomate	<i>Lycopescicumesculentum</i>	2.0
Pepino	<i>Cucumbersatibus</i>	3.8
Betabel	<i>Beta bulgarisesculenta</i>	4.3
Pulpa de zanahoria	<i>Daucus carota</i>	0.6
Piel de zanahoria	<i>Daucus carota</i>	6.6
Grano de avena	<i>Avena sativa</i>	0.3
Salvado de avena	<i>Avena Sativa</i>	0.4
Hojuelas de avena	<i>Avena sativa</i>	0.3
Salvado de centeno	<i>Secalecereale</i>	1.3
Harina de centeno	<i>Secalecereale</i>	0.5
Salvado de trigo	<i>Triticumaestivum</i>	1.0
Grano de trigo	<i>Triticumaestivum</i>	0.2
Grano de cebada	<i>Hordeumsativum</i>	0.4

1.2.5. Métodos para determinación de compuestos fenólicos

El análisis de los compuestos fenólicos en los vegetales inicia con una extracción; este procedimiento depende del tipo de vegetal que vaya a ser analizado y el compuesto fenólico que se desee obtener. El primer paso consiste en partir, moler o macerar la muestra para incrementar el área superficial, esto permite un mejor contacto con el disolvente que se utilice para extraer los compuestos de interés (Waterman y Mole, 1994). Esto también ayuda en el mezclado de la muestra para asegurar que la porción extraída es representativa de la muestra completa. Como muchos de los compuestos fenólicos se encuentran en forma de glicósidos o ésteres, la preparación de la muestra puede incluir hidrólisis ácida, alcalina e incluso enzimática para liberar los enlaces fenólicos.

Los métodos usados comúnmente para determinar y cuantificar compuestos fenólicos totales en alimentos y vegetales son el ensayo de vainillina y el de Folin-Ciocalteu.

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotungstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotungstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Julkunen, 1985).

1.3. ANTIOXIDANTES

1.3.1. Definición de antioxidante y su clasificación

Los antioxidantes son un grupo de sustancias que al estar presentes en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de éste. Como sustrato oxidable se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas de ADN (Venero, 2002). Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar o interactuar más rápido con los radicales libres de oxígeno y las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno que con el resto de las moléculas presentes, en un determinado microambiente (membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular). La acción del antioxidante es de sacrificio de su integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas funcionalmente vitales o más importantes. Su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos. Actúan como eliminadores, con el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante a favor de estos últimos. Los antioxidantes exógenos actúan como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre, por lo que la reposición de ellos debe ser continua, mediante la ingestión de los nutrientes que lo contienen (Venero, 2002).

Tabla 3. Clasificación de antioxidantes según su origen

Endógenos		Exógenos
Enzimáticos	No enzimáticos	
Superóxidodismutasa (SOD)	Glutación	Vitamina E
Catalasa (CAT)	Coenzima Q	Vitamina C
Glutación peroxidasa (GPx)	Ácido Tiotico	Compuestos fenólicos

(Venero, 2002)

Los antioxidantes endógenos están presentes en el organismo de los seres vivos y protegen frente a los radicales libres producidos durante el metabolismo, los enzimáticos actúan catalizando la reducción de algunas especies como el peróxido de hidrógeno o bien capturando metales de transición. Por otro lado los no enzimáticos pueden actuar como barreras fisiológicas que enfrenta el oxígeno a su paso desde el aire hasta las células o bien como transportadores de metales. Los antioxidantes exógenos son todos aquellos que se consumen a través de los alimentos y actúan neutralizando o capturando radicales libres (Venero, 2002).

Los compuestos fenólicos son efectivos donadores de hidrógenos. Su potencial antioxidante es dependiente del número y de la posición de los grupos hidroxilos y su conjugación, así como de la presencia de electrones en el anillo estructural, debido a la capacidad que posee el grupo aromático de soportar el desapareamiento de electrones por desplazamiento (Antolovich y col., 2002).

Los compuestos fenólicos presentan actividad antioxidante mediante la captura de radicales libres. Se consideran radicales libres aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera inestabilidad, alta reactividad y una gran capacidad de combinarse inespecíficamente con biomoléculas como carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos. Son generados continuamente como un producto del metabolismo normal de la célula e inactivados por un conjunto de mecanismos (unos enzimáticos y otros de captura). Durante el proceso metabólico una pequeña parte (2-3%) de los radicales libres pueden evadir el mecanismo redox y causar daño oxidativo a los componentes celulares. (Valavanidis y col., 2006; Hangsber, 2002). Los radicales libres son normalmente producidos a través de la ionización de oxígeno y dan como resultado especies reactivas de oxígeno, éstas incluyen superóxido (O_2^-), hidroxilo (OH^\cdot), óxido nítrico (NO^\cdot), alcohoxilo (RO^\cdot), peroxilo (ROO^\cdot) y moléculas no radicales (peróxido de hidrógeno y oxígeno singulete) (Pietta y col., 2000).

Los radicales libres se asocian con un número de enfermedades, incluyendo algunos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas. Las especies reactivas de oxígeno atacan ácidos grasos poliinsaturados en las membranas celulares que dan lugar a la peroxidación lipídica, la cual se cree que está fuertemente asociada con el proceso de envejecimiento y la carcinogenicidad.

Los compuestos fenólicos pueden también ejercer capacidad antioxidante a través de la protección o elevación de la actividad de antioxidantes endógenos. Numerosos flavonoides han mostrado capacidad de alivio sobre el estrés oxidativo por medio de la inducción de la glutatión S-transferasa, que es una enzima que se encarga de proteger a las células contra el daño del estrés oxidativo causado por peróxido de hidrógeno (Fiandeg y Schneider, 2000). Algunos flavonoides, incluyendo quercetina, miricetina y fisteina mostraron incremento en la actividad específica de la glutatión S-transferasa (Fiander y Schneider, 2000). Esta enzima que juega un papel protector contra el cáncer por xenobióticos con potencial mutagénico. La capacidad antioxidante de los componentes fenólicos es determinante por su estructura, en particular la facilidad con la cual un átomo de hidrógeno del grupo aromático puede ser donado a un radical libre y la capacidad de un compuesto aromático para soportar un electrón desapareado.

1.3.2. Determinación de la actividad antioxidante

Para comprender mejor la actividad fisiológica de los compuestos fenólicos se debe tener en cuenta que la capacidad antioxidante que poseen varía en función al grupo de compuestos estudiados y de su solubilidad en fase acuosa o lipídica. Se han desarrollado muchos métodos para la medición de la actividad antioxidante y son esencialmente métodos de inhibición: se generan especies de radicales libres y las muestras inhiben esta generación. Estos métodos varían, así como el radical libre que generan (Figura 10).

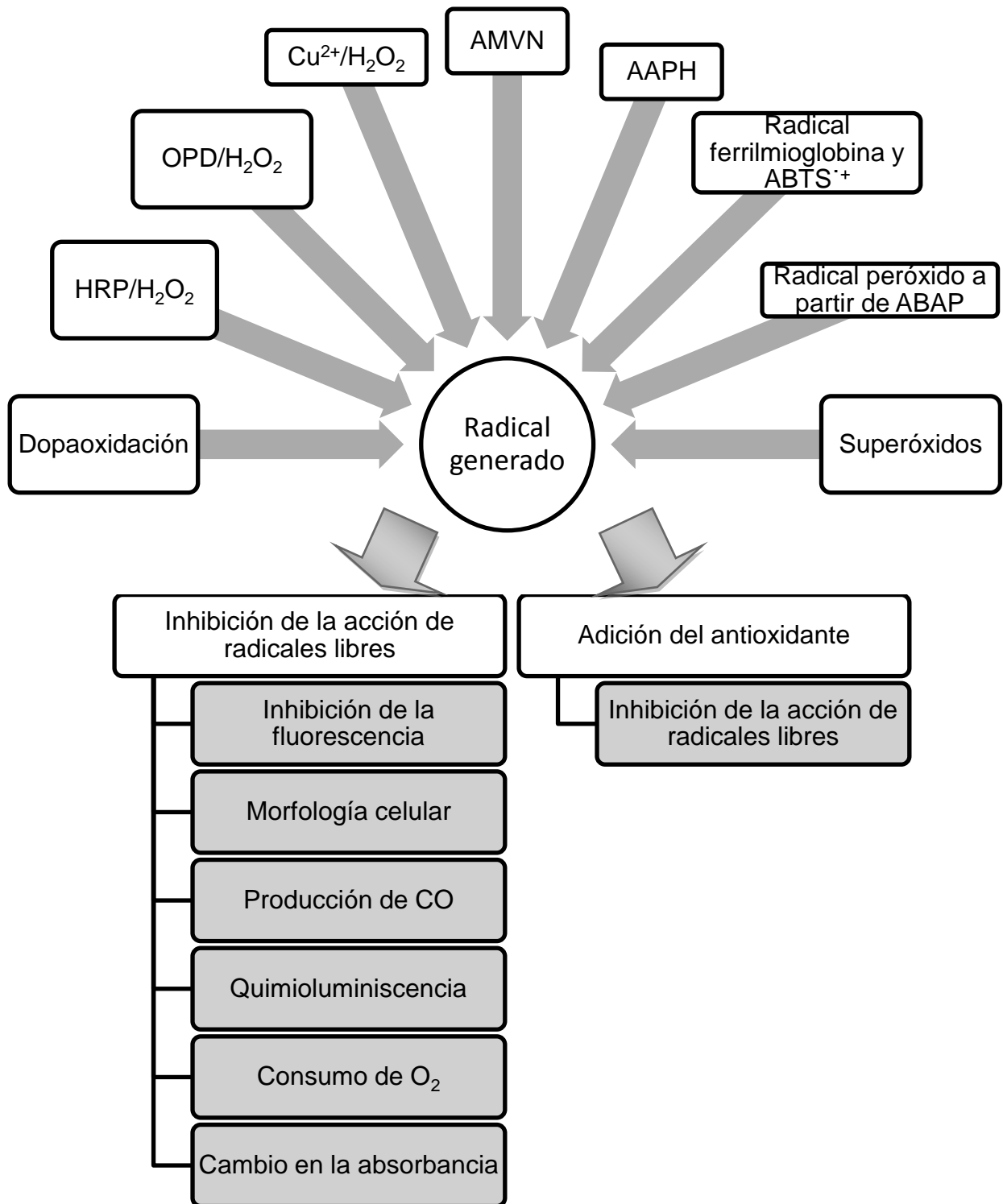


Figura 10. Métodos para determinar la actividad antioxidante. HRP, Peroxidasa de nabo; OPD, ortofenilendiamina; ABTS^{•+} 2,2'-azino bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato); ABAP, 2,2'-azobis (2-amidinopropano), AAPH, 2,2'-azobis (2-amidinopropano); AMVN, 2,2'-azobis (2,4-dimetilvaleronitrilo); TBA-RS, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico; CO, monóxido de carbono (López-Martínez y col., 2008)

Alternativamente, diversos compuestos cromógenos (ABTS^{•+}, DPPH[•], DMPD, DMPO, y FRAP) son utilizados para determinar la capacidad de los compuestos fenólicos para captar radicales libres generados, operando así en contra de los efectos perjudiciales de los procesos de oxidación, que implican especies reactivas de oxígeno (EROS). Los métodos más aplicados son ABTS^{•+} y DPPH[•] (Arnao, 2000; Montoya y col., 2003). Ambos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias. El DPPH[•] es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que el ABTS^{•+} tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato de potasio, ABAP) (Arnao, 2000; Kuskoski y col., 2004), enzimática (peroxidasa, mioglobulina), o también electroquímica (Imeh y Khokhar, 2002). Con el ABTS^{•+} se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH[•] solo puede disolverse en medio orgánico, y el DMPD sólo en medio acuoso. El radical ABTS^{•+} tiene además la ventaja de que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico, mientras que el DPPH[•] presenta un pico de absorbancia 515 nm (Kim y col., 2002).

El compuesto cromógeno ABTS^{•+} presenta color azul/verde con máximo de absorción a 342 nm, es muy soluble en agua y químicamente estable (Antolovich y col., 2002). El radical ABTS^{•+} es más indicado para ensayos de compuestos coloreados, por presentar absorción máxima próxima a la región infrarroja (734 nm) reduciendo posibilidades de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región visible o compuestos resultantes de reacción secundaria. Además el radical generado químicamente, mediante persulfato potásico, desarrollado por Re y col. (1999), fue validado por su estabilidad, reproductibilidad y por ser una alternativa mucho más viable económicamente al método (Kuskoski y col., 2004).

El método se basa en la estabilidad del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) la cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción, en solución etanólica, centrada alrededor de 520 nm. Cuando una disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical (R^{\cdot}) se produce la forma reducida DPPH-H ó DPPH-R con la consecuente pérdida del color (Figura 11) y por lo tanto la pérdida de la absorbancia (Molyneux, 2004).

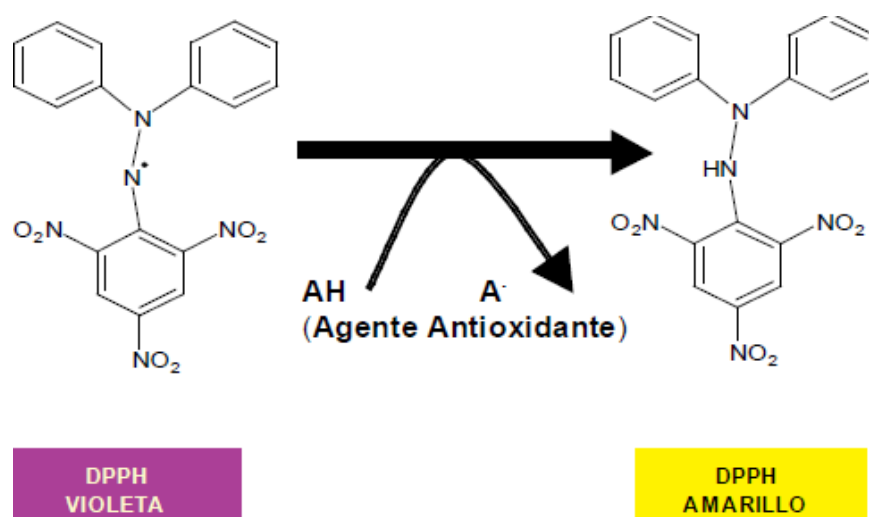


Figura 11. Reacción del radical DPPH

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1. Objetivo general

Determinar el efecto del procesamiento sobre los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de distintas variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) mexicano.

2.2. Objetivos específicos

1. Determinar el contenido de compuestos fenólicos totales en las diferentes variedades de frijol y sus productos de procesamiento.
2. Determinar las capacidades antioxidantes de las distintas variedades de frijol y sus productos de procesamiento.
3. Establecer la relación entre los compuestos fenólicos y las distintas actividades antioxidantes de las distintas variedades de frijol y sus productos de procesamiento.

2.3. Hipótesis

Los procesamientos térmicos ensayados afectarán el contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de las diversas variedades de frijol estudiadas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos

Carbonato de sodio, Scharlau 99%; reactivo de Folin-Ciocalteu, HYCEL 2N; ácido gálico, Fermont 98.1%. Metanol, etanol, persulfato de potasio, ABTS^{•+} (2-2'-Azino-bis (3-etilenbenzotiazonilo-6- ácido sulfónico), DPPH[•](1,1-difenil-2-picrilhidrazilo), y ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), Sigma. Toda el agua utilizada fue agua destilada, excepto el agua utilizada para los diferentes procesamientos térmicos.

3.2. Obtención de las distintas variedades de frijol

Las distintas variedades (Tabla 4) estudiadas fueron obtenidas en diferentes supermercados del Estado de México en el año 2012. Antes del procesamiento los frijoles fueron lavados para eliminar tierra o granos dañados. Se almacenaron a 4°C en bolsas de plástico selladas hasta el momento de ser utilizadas.

Tabla 4. Nombre y pigmentación de las diferentes variedades de frijol mexicano

Nombre o variedad	Pigmentación
Bayo	Café-crema
Flor de Mayo	Rosa con manchas moradas
Mayocoba	Crema
Negro Jamapa	Negra
Pinto	Café con manchas café oscuro

3.3. Muestras no procesadas

3.3.1. Frijol crudo

Se pesaron 25 g de cada variedad de frijol como muestra control y fueron molidas hasta obtener un polvo fino en un molino (Krupstyp F408, México) y se almacenaron a 4°C hasta su análisis.

3.3.2. Agua de remojo

Se pesaron 20 g de frijol previamente lavados y se sumergieron en 200 mL de agua potable, se dejaron en remojo durante 24 h a temperatura ambiente. Se retiró el grano del agua de remojo para su posterior análisis.

3.4. Procesamiento térmico de las diferentes variedades de frijol

En todos los casos los frijoles fueron lavados con agua en abundancia posteriormente se colocaron 15 g de frijol crudo en un recipiente con 250 mL de agua potable durante 12 h a temperatura ambiente.

3.4.1. Cocción en agua hirviendo

La cocción o hervido a presión atmosférica de las diversas variedades de frijol se realizó de acuerdo a la receta tradicional mexicana. Se colocó el grano y su agua de remojo en una olla con 2 L de agua hirviendo durante 120 min.

3.4.2. Cocción al vapor

Los granos de frijol se colocaron en la parte superior de la vaporera, se cubrió con una tapa y se sometieron a cocción con vapor generado a partir de 2.5 L de agua hirviendo, a la que se añadió el agua de remojo, bajo presión atmosférica durante 2 h y 30 min.

3.4.3. Cocción en agua hirviendo a presión controlada (15 lb)

Se colocaron los granos de frijol y el agua de remojo en una olla de presión con 250 mL de agua hirviendo, el tiempo de cocimiento fue de 30 min, éste se inició desde que el vapor salió por el regulador de presión.

Una vez transcurrido el tiempo de cocción para los tres métodos, los granos de cada una de las variedades de frijol fueron drenados y enfriados a temperatura ambiente durante 1 h, posteriormente fueron molidos. Los productos de procesamiento (grano y caldo de cocción) se almacenaron por separado a 4°C hasta su posterior análisis.

3.5. Obtención de extractos crudos

Se pesaron 5 g de cada una de las variedades de frijol y de las muestras procesadas, o bien 5 mL de agua de remojo y caldos de cocción y se colocaron en tubos de plástico protegidos de la luz, se adicionaron 25 mL de agua destilada y la mezcla se colocó en un agitador orbital (Lab Line, Modelo 3520) durante 2 h a 300 rpm a temperatura ambiente.

Las muestras no procesadas del grano de frijol posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm, a 4 °C durante 20 min, en una centrifuga (Eppendorf 5810R, Alemania) En todas se retiró el sobrenadante y se almacenó a 4°C hasta su análisis.

3.6. Determinación de compuestos fenólicos totales

Los compuestos fenólicos totales se determinaron por el procedimiento establecido por Gutiérrez y col. (2008) con modificaciones, utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu. Se tomaron 3 mL de cada extracto, se colocaron en un tubo posteriormente se adicionaron 12 mL de agua destilada y se agitó. Enseguida se tomaron 500 µL de cada una de estas disoluciones y se mezclaron con 750 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu dejando en reposo a 25°C durante 5 min, posteriormente se adicionaron 750 µL de carbonato de sodio al 20% que se preparó como se indica en el Anexo A. Se agitaron fuertemente para luego dejar reposar durante 90 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de este tiempo se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Velab Modelo VE5600UV, Alemania). Los compuestos fenólicos totales fueron expresados como miligramos de ácido gálico por gramo, basado en una curva de calibración de 0-5 mg de ácido gálico/L (Anexo A). Se usó agua destilada como blanco.

3.7. Determinación de la actividad antioxidante

3.7.1. ABTS^{•+}. 2-2'-Azino-bis (3-etilenbenzotiazonilo-6-ácido sulfónico)

La actividad antioxidante de todos los extractos fue medida de acuerdo al procedimiento descrito por (Pellegrini y col., 1999). ABTS se disolvió en agua para preparar una disolución stock. El radical catiónico (ABTS^{•+}) se produjo mediante la

mezcla de una alícuota de 5 mL de ABTS^{•+} (7mM) recién preparada (Anexo B), a la que se adicionaron 88 µL de persulfato de potasio K₂S₂O₈ (140 mM). Ésta mezcla se mantuvo en reposo por 12 h en ausencia de luz hasta que se desarrolló un color verde oscuro. Los extractos fueron probados a una concentración de 0 a 1 mg/mL de compuestos fenólicos. Los extractos fueron diluidos con metanol hasta observar una absorbancia de 0.74 a 734 nm (Huang y col., 2005). Se transfirieron 190 µL de cada extracto a una celda de cuarzo y el ensayo se inició cuando se le adicionó a la celda 1 mL de la disolución de ABTS^{•+} preformado y se determinó la absorbancia a 734 nm después de 10 min de reacción. Trolox (0.02 mmol/L) se usó como control positivo de la actividad antioxidante. El porcentaje de inhibición se calculó como:

$$\%Inhibición = \left(\frac{Abs\ inicial - Abs\ final}{Abs\ inicial} \right) \times 100$$

3.7.2. DPPH[•] (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)

La capacidad de inhibir la acción del radical DPPH[•] de los extractos fue determinada por el método de Kim y col. (2003). El radical DPPH[•] fue disuelto en etanol acuoso (etanol: agua, 80:20 v/v) para obtener una concentración final 200 nM (Anexo B). 100 µL de una serie de concentraciones de cada extracto (0 a 1 mg/mL de compuestos fenólicos) se adicionaron a 2.9 mL de la solución del radical DPPH[•]. Se utilizó como control 100 µL de metanol acuoso (metanol: agua, 80:20 v/v) adicionado a 2.9 mL de la solución del radical DPPH[•]. La mezcla fue suavemente homogenizada, posteriormente fue puesta en reposo a 25°C en la oscuridad durante 30 min. La absorbancia de las mezclas se determinó a 517 nm. Se utilizó Trolox 0.20 mM como control antioxidante. La actividad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición del radical. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

3.8. Análisis estadístico

Para todos los experimentos se utilizó un diseño por bloques completamente al azar y la significancia (p<0.05) de diferencia de medias entre tratamientos fue establecido utilizando ANOVA seguido de una comparación de Duncan utilizando el software SPSS 8.0 para Windows.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Procesamiento de las muestras

4.1.1. Agua de remojo

Mediante el tratamiento previo conocido comúnmente como remojo, se observó un aumento en el volumen del grano, en algunas variedades como mayocoba y bayo existió incluso ruptura de la testa del grano. Se mostró una ligera pigmentación del agua que resultó en la baja retención de compuestos fenólicos en éste producto.



Figura 12. Frijol crudo y agua de remojo de las cinco variedades de estudio. a) frijol crudo; b) agua de remojo

Durante el procesamiento térmico se observó una serie de cambios físicos en el grano, tales como el aumento del volumen, el reblandecimiento de la testa, la elevación de la humedad y el cambio de color tanto del grano como del caldo de cocción. Se observó que los caldos de cocción mostraron colores oscuros y presentaron un bajo contenido de compuestos fenólicos, ya que durante el procesamiento, algunos pigmentos naturales como los flavonoides se pierden, y en otros las interacciones de taninos con el hierro generan compuestos coloreados que no están presentes en el producto original (Badui-Dergal, 1999).

4.1.2. Procesamiento al vapor

Mediante el procesamiento con vapor a presión atmosférica, se observó un mayor tiempo para lograr la cocción del grano de frijol, comparado con otros dos métodos evaluados durante éste estudio. Los granos obtenidos después de 2 h y 15

minmostraron un menor incremento en el volumen del grano al compararlo con los otros métodos, debido a que no estuvieron en contacto directo con el agua. El caldo de cocción que se usó para generar el vapor mostró colores oscuros que no se relacionan con el contenido de compuestos fenólicos totales (Figura 13).

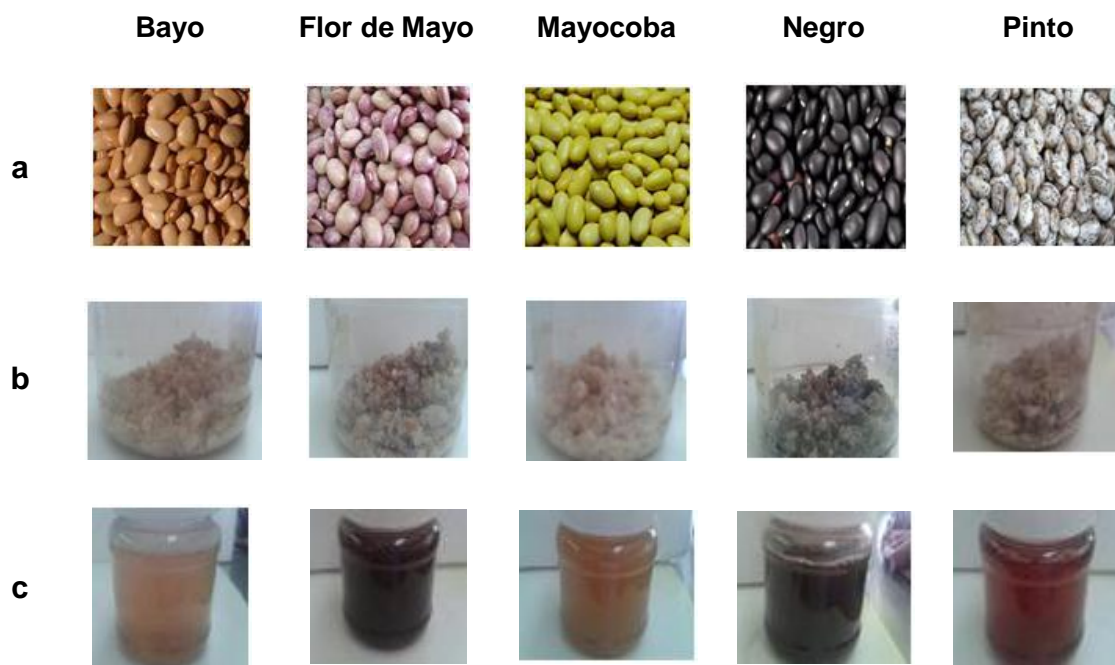


Figura 113. Frijol de las cinco variedades de estudio y sus productos de procesamiento por cocción al vapor. a) frijón crudo; b) grano; c) caldo de cocción

4.1.3. Cocción tradicional

La cocción tradicional, que se realiza con agua hirviendo a presión atmosférica, requirió de un tiempo de 2 horas para lograr la cocción del grano. Este tiempo se determinó mediante la comparación de las cinco variedades de frijol, y se determinó que habían alcanzado su cocción cuando al menos 7 de 10 de los granos del frijol al ser oprimidos entre los dedos se rompieron con facilidad. Los caldos de cocción que se obtuvieron mediante éste tratamiento fueron de color más oscuro al compararlos con los obtenidos mediante los otros dos tratamientos de cocción (Figura 14).

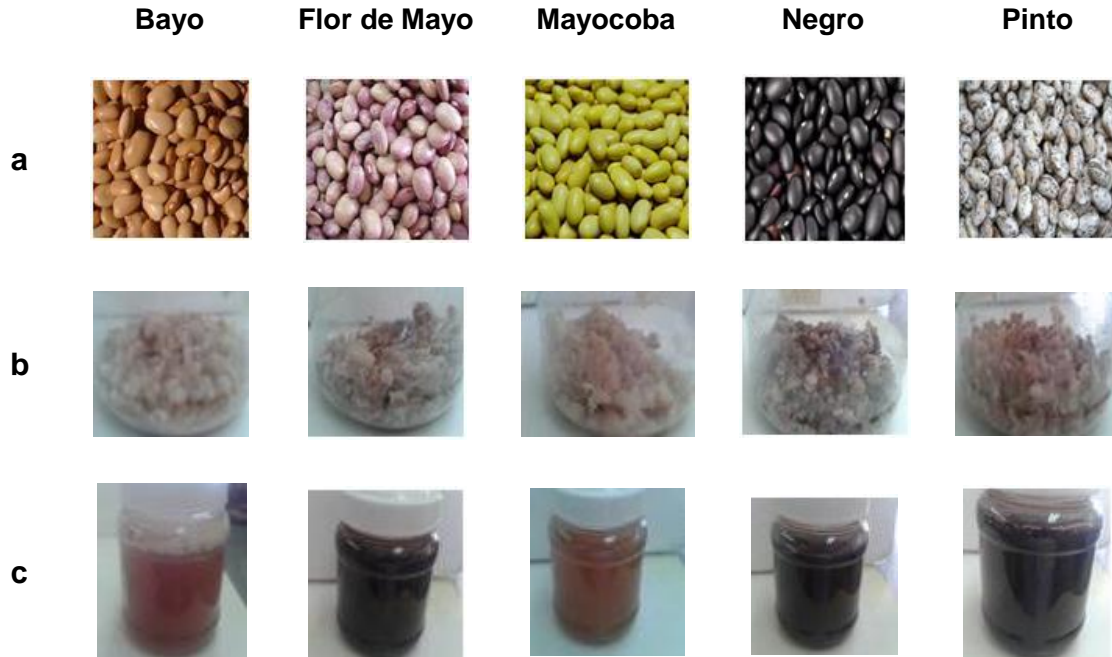


Figura 124. Frijol de las cinco variedades de estudio y sus productos de procesamiento por cocción tradicional. a) frijol crudo; b) grano; c) caldo de cocción

4.1.4. Procesamiento a presión controlada

El método a presión controlada requirió de un tiempo de 30 minutos, se observó una cocción más uniforme del grano al contrastarlo con los otros tratamientos térmicos, mediante la elevación de la presión se aumentó la temperatura y se redujo el tiempo necesario para lograr que los granos se cocieran. A nivel del mar, el agua hierve a aproximadamente 100°C; la olla de presión trabaja a una presión de 15 lb a esta presión la temperatura es de 121°C. Se estima que por encima de los 100°C las reacciones de cocción duplican su índice cada que se aumente 10°C, el incremento de 21°C es bastante significativo y la olla de presión cocina los alimentos más rápido que cualquier método tradicional (Hecht, 2001). La disminución del tiempo de cocción se vio reflejada en el contenido de compuestos fenólicos totales después del procesamiento (Figura 15).



Figura 135. Frijol de las cinco variedades de estudio y sus productos de procesamiento por cocción a presión controlada. a) frijol crudo; b) grano; c) caldo de cocción

Un fenómeno más que explica la coloración en los caldos de cocción son las reacciones de Maillard, mediante la exposición al calor se generan una serie de reacciones en donde interactúan los diferentes compuestos que forman el grano de frijol, de ésta forma los colores oscuros se deben a reacciones de pardeamiento no enzimático entre las proteínas y los azúcares reductores que se encuentran en el grano, dando como resultado melanoidinas coloreadas, que originan color amarillo, café e incluso negro (Badui-Dergal, 1999). Sin embargo las melanoidinas generadas a partir de las reacciones de Maillard se ha descrito que poseen actividad antimicrobiana, antimutagénica, antitumoral, antioxidante, producen supresión del crecimiento celular tumoral e inhibición de enzimas digestivas. Su papel como antioxidante *in vivo* no es conocido aunque distintos estudios *in vitro* apoyan su papel beneficioso como antioxidante del radical hidroxilo, superóxido y peróxido, actúan además como quelantes de metales como zinc y cobre (Valls y col., 2004).

4.2. Compuestos fenólicos totales

Se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales presentes en frijol para comprobar y justificar su actividad antioxidante y los beneficios a la salud que se han atribuido al frijol como reducción de enfermedades coronarias, efectos protectores contra algunos tipos de cáncer y el decremento del riesgo de obesidad y diabetes.

Frijol crudo

Los contenidos de compuestos fenólicos totales se muestran en las tablas 5 y 6. Se realizó el análisis en frijol crudo de las cinco variedades de estudio como referencia para obtener el porcentaje de pérdida de compuestos fenólicos después del procesamiento térmico. El frijol crudo mostró un contenido de compuestos fenólicos totales en un intervalo de 17.6 a 35 mgAGE/g de muestra seca, siendo la variedad negro la variedad con mayor contenido de compuestos fenólicos, seguida por las variedades pinto, flor de mayo, bayo y mayocoba con la menor cantidad de compuestos fenólicos totales. Los resultados coinciden con la pigmentación de la testa del grano, es decir, frijoles cuya testa es más oscura muestran mayores contenidos de compuestos fenólicos que aquellos cuya coloración es más clara.

Tabla 5. Contenido de compuestos fenólicos totales (mgAGE/ g) de las cinco variedades y sus productos de procesamiento térmico

Variedad	Frijol Crudo	Al vapor	Receta tradicional	A presión controlada
Bayo	27.3±0.7 ^a	15.2±0.4 ^c	7.3±0.6 ^d	20.4±3.3 ^b
Flor de mayo	28.3±0.9 ^a	10.1±1.9 ^c	12.6±2.3 ^c	21.0±1.6 ^b
Mayocoba	17.6±3.1 ^a	5.5±1.3 ^b	4.2±0.9 ^b	6.3±0.4 ^b
Negro	35.0±3.1 ^a	18.9±4.4 ^{b,c}	16.8±4.5 ^c	26.5±2.1 ^b
Pinto	31.2±2.3 ^a	17.2±4.6 ^b	7.4±1.2 ^c	18.2±5.4 ^b

^{a-d} Letras diferentes en una misma fila significa que las medias difieren significativamente (p<0.05)

López-Martínez y col. (2012) determinaron el contenido de compuestos fenólicos totales en cuatro variedades de frijol y reportaron 49.5 mg/g para frijol negro Jamapa, 31.6 mg/g en frijol pinto, 27.6 mg/g en frijol flor de mayo y 18.5 mg/g en frijol mayocoba, los resultados obtenidos en el presente estudio muestran la misma tendencia (Tabla 5). En el 2005 Terrence y col. determinaron el contenido de compuestos fenólicos en cuatro variedades de frijol en Malasia y obtuvieron los siguientes resultados negro 44 mg/g, rojo 93.6 mg/g, café 91.4 mg/g y blanco 4.9 mg/g los resultados fueron expresados como mg de catequina equivalentes y la extracción se realizó con acetona acuosa al 80%. Dave-Oomuth y col. (2010) realizaron determinación de compuestos fenólicos totales los cuales fueron expresados en mg de catequina equivalentes realizando dos extracciones diferentes, acuosa y con acetona al 70%, los resultados fueron los siguientes negro 13.33 mg/g, blanco 13.83 mg/g, rosa 13.09 mg/g y pinto 10.04 mg/g para la extracción con agua y negro 10.77 mg/g, blanco 4.15 mg/g, rosa 11.89 mg/g y pinto 13.26 mg/g para la extracción con acetona acuosa al 70%. Todas las variedades fueron de origen canadiense. Estudios recientes realizados en Estados Unidos coinciden de manera significativa con los obtenidos durante este estudio. Luthria y Pastor (2006) realizaron un estudio con 10 diferentes variedades comerciales y reportaron un contenido de compuestos fenólicos totales de 38 mg/g en frijol negro americano, 25 mg/g en frijol rojo, 19.1 mg/g en frijol de coloración crema con manchas rojas, en los granos de frijol rosado 34.4 mg/g y 30.7 mg/g para frijol pinto, los resultados están expresados en mg de ácido gálico equivalente por lo que es una referencia importante por la similitud del procedimiento realizado, las diferencias podrían deberse a que las variedades no son las mismas pero se asemejan en cuanto al color de la testa del grano. En el 2006 Gálvez-Ranilla y col. determinaron el contenido de compuestos fenólicos totales de las variedades con mayor importancia económica y comercial en Brasil y obtuvieron los 60.4 mg/g en frijol negro, 70 mg/g en frijol de coloración roja, 68 mg/g en frijoles crema con manchas rojas, 74 mg/g en frijol rosa, 63.4 mg/g en frijol pinto y 89.9 mg/g en frijol de color de testa crema.

Todas las determinaciones son en frijol crudo y las diferencias que existen entre los resultados previos y los obtenidos en éste estudio se deben a el tipo de extracción, la variabilidad genética, así como un creciente mejoramiento genético a partir de especies ancestrales.

Granos procesados

El contenido de compuestos fenólicos totales variaron ampliamente entre los métodos de cocción estudiados ($p < 0.05$) y está relacionado con la temperatura en cada uno de los procedimientos, así como con los tiempos de cocción a los que se sometieron mostrando una mayor pérdida de compuestos fenólicos en aquellos donde el tiempo de cocción es más prolongado.

El método de cocción a presión controlada mostró el mayor contenido de compuestos fenólicos totales en la variedad negro con 26.5 mgAGE/g de muestra y la variedad que exhibe menor cantidad de ellos es la variedad mayocoba 6.3mgAGE/g. Estos intervalos se mantienen con la misma tendencia que el frijol crudo. Mediante este tratamiento se perdió 36.3% en promedio del contenido inicial de compuestos fenólicos totales.

El método de procesamiento al vapor a presión atmosférica exhibió un porcentaje de detrimento de 53.64% de compuestos fenólicos en el grano. En este tratamiento la variedad mayocoba tuvo el menor contenido de compuestos fenólicos totales (5.5 mgAGE/g) y la variedad negro conservó en el grano únicamente 18.9 mgAGE/g de los que contenía la muestra de frijol crudo (35 mgAGE/g).

La cocción en agua hirviendo a presión atmosférica, o cocción tradicional, fue el método de procesamiento térmico que más afectó el contenido de compuestos fenólicos totales, en promedio el detrimento de éstos compuestos mediante este proceso culinario es de 66.6%.

Agua de remojo

Se midieron los compuestos fenólicos presentes en el agua de remojo con el objetivo de evaluar la solubilidad y la pérdida de dichos compuestos en este tratamiento previo a cualquier procesamiento térmico. Los compuestos fenólicos y en especial los presentes en el frijol que pertenecen al grupo de los flavonoides son hidrofílicos, solubles en agua y disolventes como metanol y etanol (Abd y Habiba, 2003), por lo cual se esperaba la solubilidad de estos compuestos durante el remojo, sin embargo el agua mostró bajas concentraciones de compuestos fenólicos totales, es decir, una pérdida mínima de 4.1% en promedio.

Durante el remojo hubo un incremento en el volumen del grano. El agua que se usó para las variedades negro y pinto mostraron un contenido de 2.0 y 1.4 mgAGE/mL, respectivamente. El agua de remojo de las variedades bayo, flor de mayo y mayocoba presentaron concentraciones menores de 1 mgAGE/mL (Tabla 6).

Caldos de cocción

Los caldos de cocción mostraron mayor concentración de compuestos fenólicos comparados con el agua de remojo. Esto se debe a que la elevación de la temperatura del agua facilita la solubilidad de dichos compuestos, sin embargo una cantidad de ellos se pierden por la misma razón al mantenerlos a elevadas temperaturas durante tiempos prolongados. En general el caldo obtenido mediante la cocción a presión controlada fue el que mostró el mayor contenido de compuestos fenólicos.

El caldo obtenido de la cocción de todas las variedades contiene de 1.0 a 6.4 mgAGE/mL (Tabla 6), no se observa una tendencia definida ya que las variedades bayo, mayocoba y pinto mostraron el mayor contenido de compuestos fenólicos en el caldo de cocción obtenido mediante el procesamiento a presión controlada. Mientras que los caldos de las variedades flor de mayo y negro alcanzaron mayores concentraciones de compuestos fenólicos mediante los procesamientos con agua hirviendo y con vapor a presión atmosférica, respectivamente.

El caldo de cocción derivado de los diferentes métodos de procesamiento térmico presentaron diferencia significativa ($p < 0.05$), excepto en el frijol negro donde no se observó diferencia entre los caldos de cocción por diferentes métodos culinarios y el agua de remojo.

Tabla 6. Contenido de compuestos fenólicos totales (mgAGE/ mL) del agua de remojo y los caldos de cocción de las cinco variedades

Variedad	Agua de remojo	Vaporera	Olla	Presión
Bayo	0.9±0.2 ^a	3.0±0.6 ^b	4.1±0.2 ^c	4.2±0.4 ^c
Flor de mayo	0.9±0.3 ^a	1.4±0.7 ^a	6.4±3.2 ^b	4.2±0.36 ^{a,b}
Mayocoba	0.8±0.2 ^a	2.6±0.5 ^c	1.7±0.4 ^b	2.8±0.3 ^c
Negro	2.0±0.9 ^a	3.7±1.1 ^a	2.4±1.5 ^a	3.5±0.2 ^a
Pinto	1.4±0.3 ^a	4.9±0.4 ^b	1.0±0.1 ^a	5.5±0.4 ^b

^{a-c} Letras diferentes en una misma fila significa que las medias difieren significativamente ($p < 0.05$).

Se realizó una comparación del porcentaje de pérdida de compuestos fenólicos totales por variedad, para obtener la diferencia entre cada uno de los procesos térmicos a los cuales se sometieron los granos de frijol de las diferentes variedades de estudio. En las gráficas (Figuras 15 a 19) la primera barra muestra el frijol crudo que se tomó como referencia (100%) del contenido de compuestos fenólicos antes del tratamiento térmico para cada variedad. En el frijol bayo se observó que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el frijol crudo y todos los métodos de procesamiento, los tratamientos térmicos también revelaron diferencia significativa entre ellos. En el grano de frijol después del tratamiento se conserva 55.7%, 26.7% y 74.5% de compuestos fenólicos totales, mediante la cocción al vapor, cocción tradicional y cocción a presión controlada, respectivamente. La presencia de compuestos fenólicos en el caldo de cocción es, en el mismo orden, de 11%, 15% y 15.5% (Figura 16). Por lo tanto el método que mejor conservó los compuestos fenólicos es el método a presión controlada, seguido por el método con vapor y finalmente la cocción tradicional en la que se perdió más de 50% .

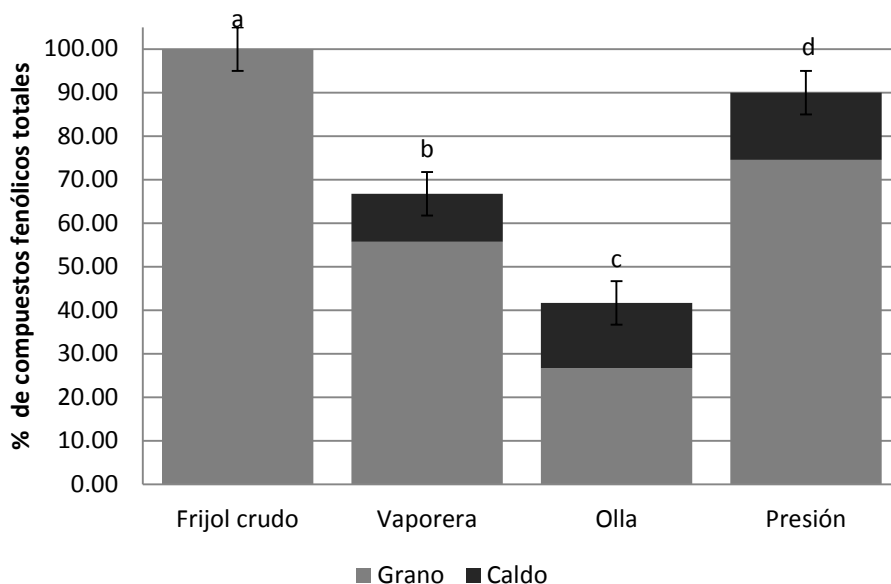


Figura 16. Compuestos fenólicos totales (%) en frijol crudo y procesado (vaporera, olla, presión) de la variedad bayo. Letras diferentes en cada barra muestran diferencia significativa ($p < 0.05$).

La variedad flor de mayo mostró diferencia significativa entre el contenido de compuestos fenólicos en el grano antes del tratamiento y la suma del contenido de éstos compuestos en sus productos de procesamiento. Mediante la cocción a presión controlada se observó una pérdida de 11.2%, con el tratamiento en agua hirviendo se pierde 33% y el procesamiento que más afectó el contenido de compuestos fenólicos fue mediante vapor para ésta variedad con una disminución de 59.3%. En la figura 17 se observa que existe una mínima retención de compuestos fenólicos en el caldo de cocción obtenido mediante el proceso con vapor a presión atmosférica, a pesar de que el color del caldo era más oscuro que el obtenido mediante la cocción a presión controlada.

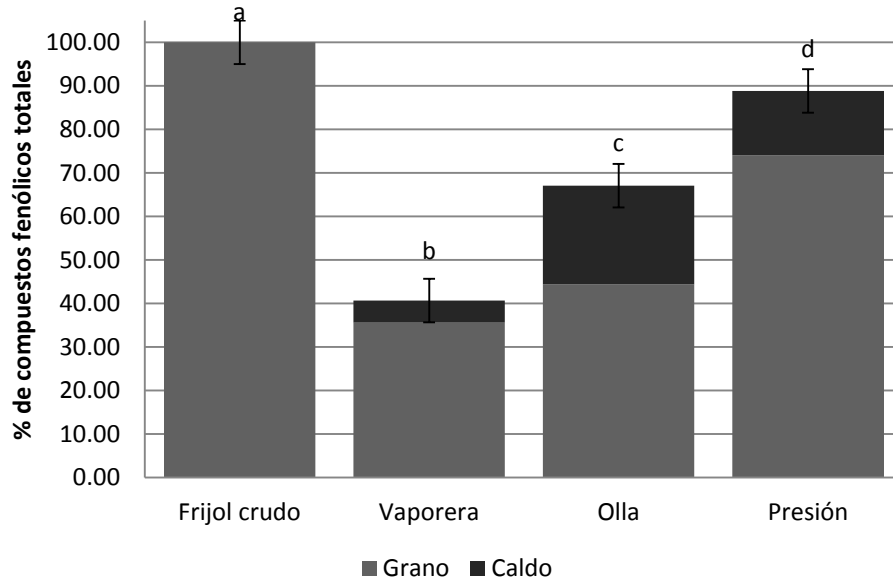


Figura 17. Compuestos fenólicos totales (%) en frijol crudo y procesado (vaporera, olla, presión) de la variedad flor de mayo. Letras diferentes en cada barra muestran diferencia significativa ($p < 0.05$).

La variedad mayocoba es la variedad que presenta la pigmentación más clara comparada con el resto de las variedades de estudio, y la pérdida de sus compuestos fenólicos totales mediante el tratamiento térmico fue mayor. El método que mejor mantuvo su contenido original es el método a presión controlada en el que se perdió 47.9% de compuestos fenólicos, mediante la cocción en vaporera disminuyó en 54.2% y la cocción con olla tradicional perdió 66.4%. En esta variedad se observa que el frijol crudo muestra diferencia significativa con todos los métodos de procesamiento ($p < 0.05$), sin embargo los métodos a presión controlada y con vapor a presión atmosférica no presentan diferencia significativa entre sí ($p > 0.05$), pero estos métodos si presentan diferencia significativa al compararlos con el método de procesamiento con agua hirviendo a presión atmosférica o cocción tradicional (Figura 18).

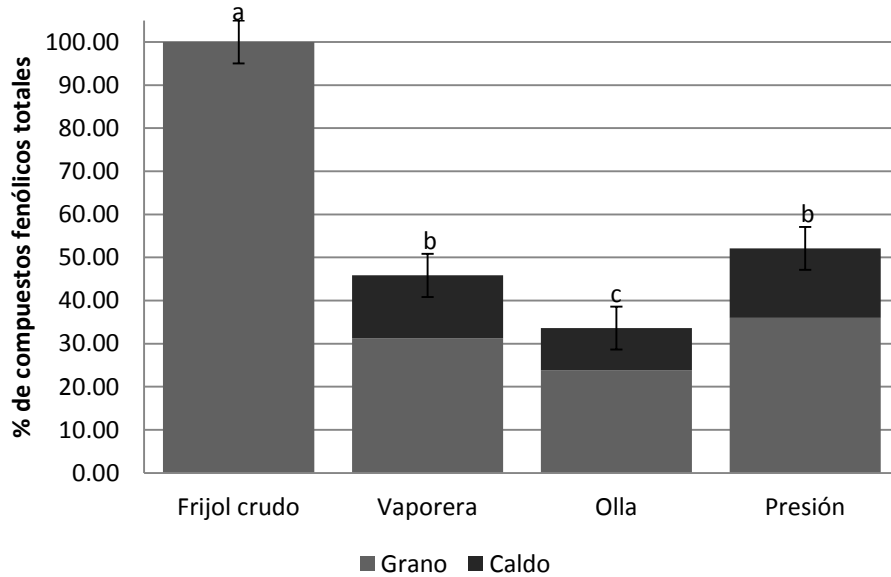


Figura 148. Compuestos fenólicos totales (%) en frijol crudo y procesado (vaporera, olla, presión) de la variedad mayocoba. Letras diferentes en cada barra muestran diferencia significativa ($p < 0.05$), letras iguales en más de una columna representan que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$)

La figura 19 muestra los porcentajes de compuestos fenólicos totales que se conservan en el grano y su caldo de cocción del frijol negro después de cada uno de los tratamientos a los que se sometieron, comparados con el contenido que se observó en el frijol crudo. En el grano de frijol y mediante la cocción a presión controlada se conserva 75.6% y 10% en el caldo de cocción; en el tratamiento con vapor se mantiene en el grano 53.4% y en el caldo 10.6%; en el procesamiento tradicional del frijol negro prevalece 48% en el grano y 6.9% en el caldo de cocción. El frijol crudo mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) con los productos de procesamiento. No hay diferencia significativa entre los métodos con vapor y con agua hirviendo a presión atmosférica ($p > 0.05$), existe diferencia significativa de los dos métodos anteriores comparados con el método a presión controlada para el frijol negro.

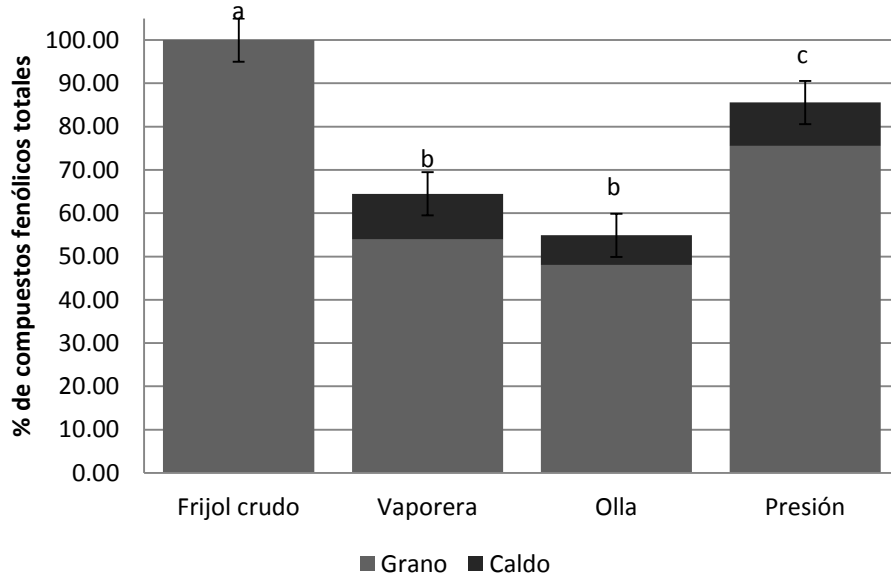


Figura 159. Compuestos fenólicos totales (%) en frijol crudo y procesado (vaporera, olla, presión) de la variedad negro. Letras diferentes en cada barra muestran diferencia significativa ($p < 0.05$, letras iguales en más de una columna representan que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$)).

El frijol pinto mostró la mayor pérdida de compuestos fenólicos totales mediante el tratamiento con olla tradicional (73.1%) y el que mejor los conserva es el tratamiento con olla a presión controlada (23.8% de pérdida). En esta variedad no se observa diferencia significativa entre los métodos de cocción a presión controlada y el método con vapor a presión atmosférica ($p > 0.05$), existe diferencia significativa entre el frijol crudo y cada uno de los métodos de procesamiento térmico.

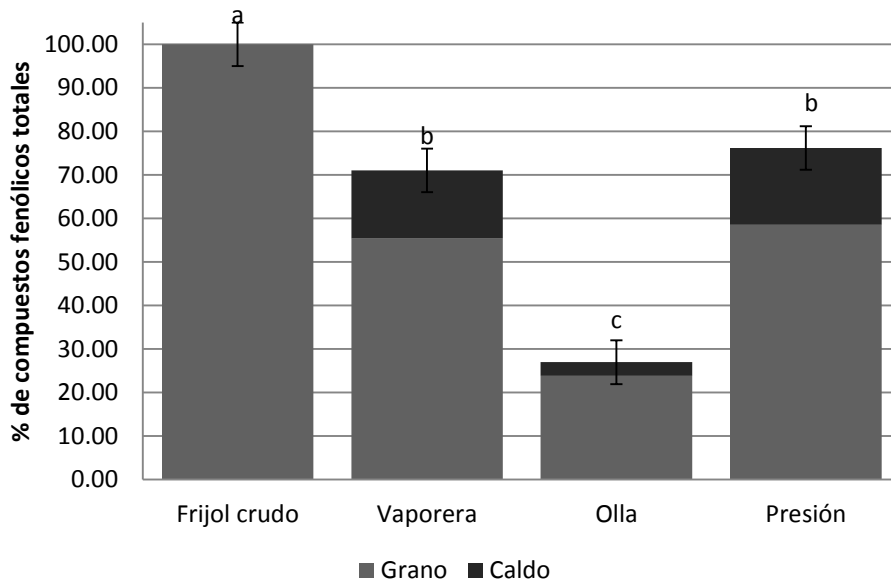


Figura 20. Compuestos fenólicos totales (%) en frijol crudo y procesado (vaporera, olla, presión) de la variedad pinto. Letras diferentes en cada barra muestran diferencia significativa ($p < 0.05$), letras iguales en más de una columna representan que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$)

4.3. Actividad antioxidante

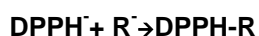
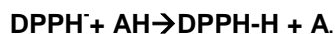
Los porcentajes de inhibición muestran diferencia significativa entre el frijol crudo y cada uno de los métodos de procesamiento térmico ($p > 0.05$). Se muestra cada variedad de estudio en cada una de las gráficas. En todas existe una pérdida del porcentaje de inhibición de los radicales $ABTS^{\cdot+}$ y $DPPH^{\cdot}$ después de cualquier tratamiento térmico. Sin embargo, se observa una menor pérdida de la actividad antioxidante mediante el método de cocción a presión controlada con un intervalo de 34.4% a 67.5% para $ABTS^{\cdot+}$ y de 0.7% a 37.4% para $DPPH^{\cdot}$. Esto puede explicarse debido a que al elevar la presión se eleva la temperatura y se reducen los tiempos a los cuales se somete el grano de frijol para su cocción. El agua de remojo muestra el menor porcentaje de inhibición de los radicales con un intervalo de 3.6% a 7.6% para el radical $ABTS^{\cdot+}$ y de 2.2% a 4.3% para el radical $DPPH^{\cdot}$. Entre los métodos utilizados para determinar la capacidad de un antioxidante para captar radicales libres, el radical $ABTS^{\cdot+}$ es uno de los más aplicados, al considerarse un método de elevada sensibilidad, práctico, rápido y muy estable; a

pesar de esto los valores de actividad antioxidante pueden depender del tiempo escogido para efectuar la medida. La absorbancia medida por el método ABTS^{•+} se determinó a los 10 minutos; los resultados obtenidos por algunos investigadores indican que la reacción con el radical ABTS^{•+} no se completa hasta pasado 1 minuto, y según Re y col. (1999) el tiempo de 4 minutos es el más apropiado. No obstante, Sellapan y col. (2002), sugieren tiempos de medida de 6 minutos para los patrones de referencia y de 7 minutos para los compuestos puros, extractos de plantas o de alimentos, sin embargo, se ha comprobado que el tiempo de vida media de los radicales libres puede ser superior a los 7 minutos.

Los flavonoides presentes en el frijol tienen una buena actividad antioxidante ya que tanto las antocianinas como los flavonoles tienen sustituciones 3' 4' ortodihidroxi en el anillo B, otra característica que les aporta una buena actividad antioxidante son las disposiciones en posición meta en los carbonos 5 y 7.

El kaempferol presente en el frijol mayocoba se ve favorecido por el doble enlace en el carbono 2 y las antocianinas presentes en los frijoles de testa oscura elevan su actividad antioxidante por los grupos 4 ceto y 3 hidroxilo (Tsimogiannis & Oreopoulou, 2006). Los frijoles de testa oscura muestran mayor actividad antioxidante debido a la estructura de los compuestos fenólicos propios de éstas variedades.

La capacidad para secuestrar el radical DPPH[•] está en función al contenido del principio activo presente en cada una de las plantas en estudio. La reducción de la concentración del DPPH[•] está indicada como el decremento de la absorbancia en el tiempo. La reacción producida es la siguiente:



El frijol bayo antes del procesamiento mostró actividad antioxidante sobre todo para el radical ABTS^{•+} preformado mostrando un porcentaje de inhibición superior a 60%, mediante el procesamiento a presión controlada el porcentaje de inhibición se conserva en un 50% para el radical ABTS^{•+}, el agua de remojo mostró las mismas actividades antioxidantes para ambos radicales. Existe diferencia

significativa entre los granos obtenidos a partir de cada uno de los métodos de cocción ($p < 0.05$) en el porcentaje de inhibición del radical $ABTS^{\cdot+}$, así como para el radical $DPPH^{\cdot}$.

El caldo de cocción del frijol bayo presentó diferencia significativa al compararlo con el agua de remojo ($p < 0.05$), sin embargo no existe diferencia ($p > 0.05$) entre los diferentes métodos de cocción por los que se obtiene (Figura 21).

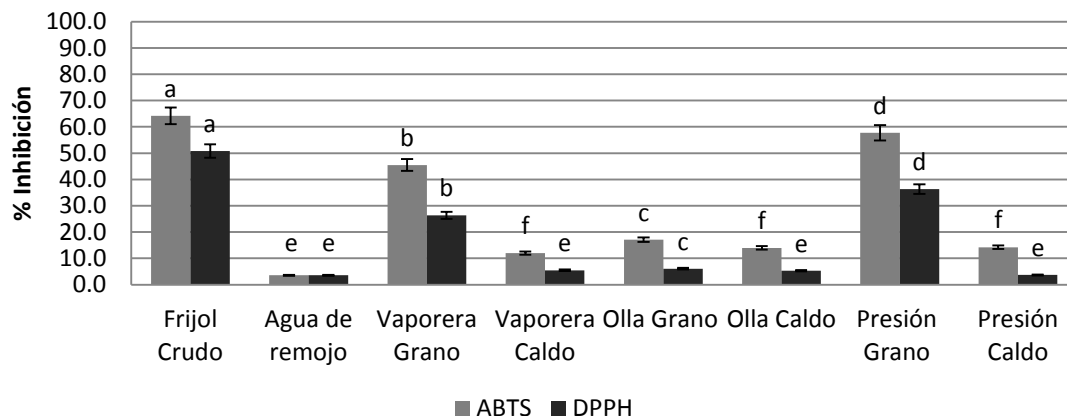


Figura 161. Actividad antioxidante de frijol bayo y sus productos de procesamiento. Medias con diferentes letras dentro de cada panel para la misma actividad antioxidante son diferentes ($p > 0.05$)

La variedad de frijol flor de mayo mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el frijol crudo y los granos obtenidos después de su procesamiento, el frijol crudo muestra actividad antioxidante contra ambos radicales. La inhibición de radicales que muestra el agua de remojo y el caldo obtenido mediante la cocción al vapor, es mínima para ambos radicales en un intervalo de 3.4% a 14.6%. En este caso el caldo que se obtiene mediante la cocción tradicional tiene una elevada actividad antioxidante (42.5%) comparada con el grano obtenido mediante el mismo tratamiento (31.1%). No existe diferencia significativa entre el agua de remojo y los caldos obtenidos mediante vapor y cocción a presión controlada, pero todos ellos muestran diferencia ($p < 0.05$) al compararlos con el caldo obtenido en olla, éste último presentó actividad antioxidante del 42.5% para el radical $ABTS^{\cdot+}$ y 12.5% para el radical $DPPH^{\cdot}$ (Figura 22).

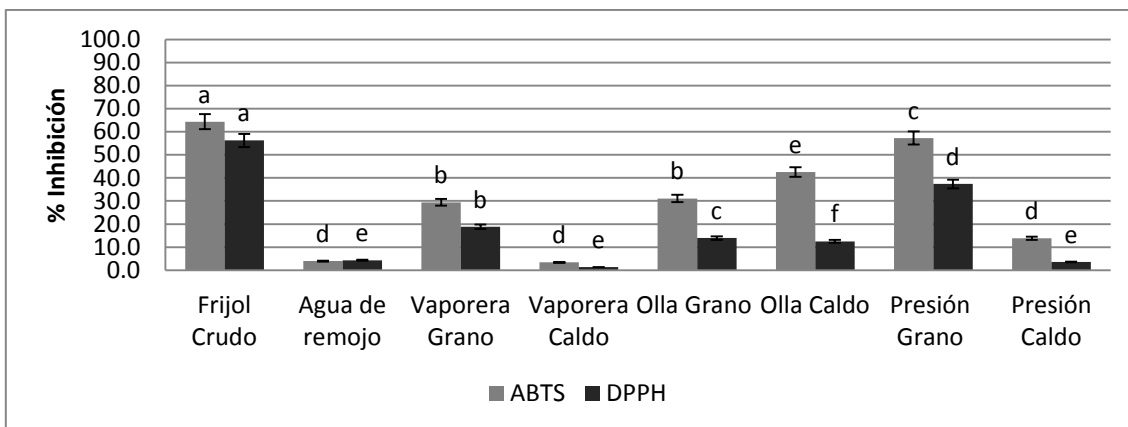


Figura 172. Actividad antioxidante de frijol flor de mayo y sus productos de procesamiento. Medias con diferentes letras dentro de cada panel para la misma actividad antioxidante son diferentes ($p > 0.05$)

La figura 23 muestra el porcentaje de inhibición de los radicales $ABTS^{•+}$ y $DPPH^{\cdot-}$ de la variedad mayocoba, como se esperaba de acuerdo a los resultados obtenidos en la determinación de compuestos fenólicos totales, la actividad antioxidante de ésta variedad es menor que el resto de las variedades de estudio. El grano después de la cocción a presión controlada mostró 34.41% de inhibición del radical $ABTS^{•+}$, sin embargo su actividad antioxidante para el radical $DPPH^{\cdot-}$ es prácticamente nula (0.74%). Existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los procedimientos a presión controlada y frijol crudo. No hay diferencia significativa en los métodos de cocción al vapor y en olla a presión atmosférica, si comparamos los granos de la variedad mayocoba, en el porcentaje de inhibición del radical $DPPH^{\cdot-}$. En la actividad antioxidante evaluada mediante la inhibición del radical preformado $ABTS^{•+}$ se observa que al comparar los granos procesados muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) con el grano crudo, sin embargo entre los métodos al vapor y en olla no se observa diferencia significativa. El agua de remojo y el caldo de cocción generado a partir de la cocción en olla de presión no muestra diferencia en el porcentaje de inhibición del radical $ABTS^{•+}$, sin embargo en el radical $DPPH^{\cdot-}$ son diferentes el agua de remojo y el caldo de cocción a presión, y no hay diferencia entre el agua de remojo y los caldos generados por cocción tradicional y con vapor.

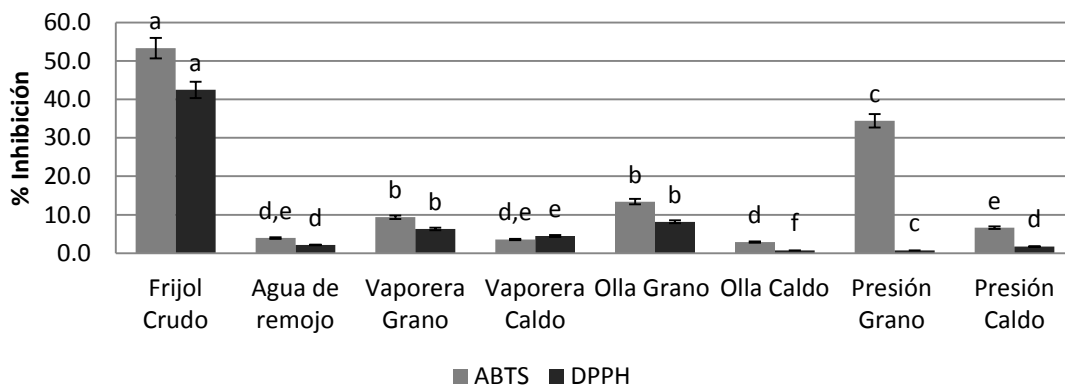


Figura 183. Actividad antioxidante de frijol mayocoba y sus productos de procesamiento. Medias con diferentes letras dentro de cada panel para la misma actividad antioxidante son diferentes ($p > 0.05$)

El frijol negro presenta una actividad antioxidante mayor comparada con las demás variedades para los radicales $ABTS^{\cdot+}$ (87.2%) y $DPPH^{\cdot-}$ (69.2%). Se observa un detrimento significativo ($p < 0.05$) en la actividad antioxidante en el grano y en el caldo después de la cocción. Los caldos formados mediante los tres procesos culinarios, así como el agua de remojo, presentan bajos porcentajes de inhibición si los comparamos con el frijol crudo. En la evaluación de la inhibición del radical $ABTS^{\cdot+}$ que ejercen los extractos del grano se observa que los métodos olla-vapor, así como vapor-presión no muestran diferencia significativa entre sí, pero sí existe diferencia entre los métodos en olla a presión atmosférica y el método a presión controlada. Todos los granos después del procesamiento muestran diferencia significativa con respecto al grano crudo en la inhibición de los radicales $ABTS^{\cdot+}$ y $DPPH^{\cdot-}$. No se observa diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los caldos obtenidos mediante los tres tratamientos térmicos y el agua de remojo (Figura 24).

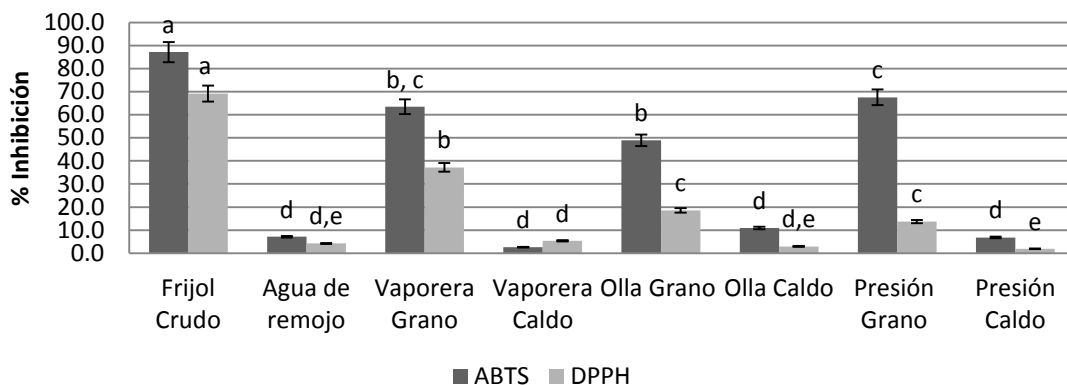


Figura 194. Actividad antioxidante de frijol negro y sus productos de procesamiento. Medias con diferentes letras dentro de cada panel para la misma actividad antioxidante son diferentes ($p > 0.05$)

La variedad pinto es la segunda con mejor actividad antioxidante, después del frijol negro, se observa una importante disminución en el porcentaje de inhibición para los radicales $ABTS^{\bullet+}$ y $DPPH^{\bullet}$ después de todos los tratamientos térmicos tanto en grano como en el caldo de cocción. En la actividad antioxidante evaluada mediante la inhibición de los dos radicales no se observa diferencia significativa entre los granos obtenidos mediante los procesos a vapor y a presión controlada ($p > 0.05$). El agua de remojo no es diferente ($p > 0.05$) con respecto a los caldos de cocción, y éstos no difieren significativamente por tratamiento (Figura 25).

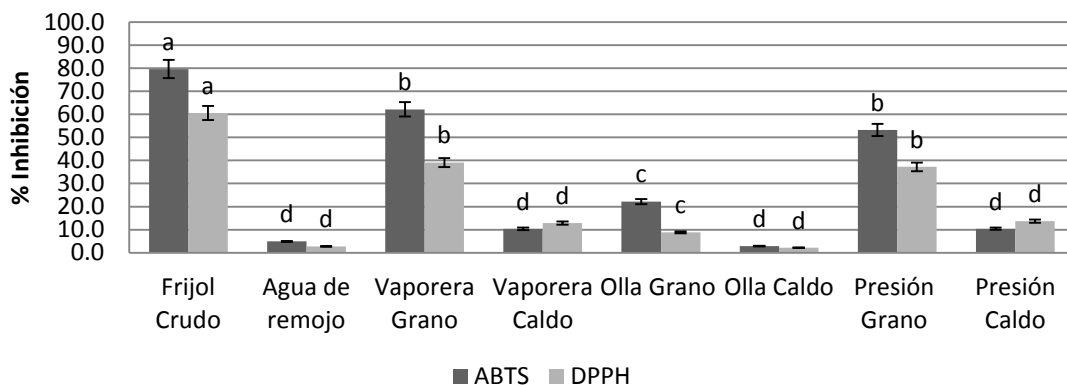


Figura 205. Actividad antioxidante de frijol pinto y sus productos de procesamiento. Medias con diferentes letras dentro de cada panel para la misma actividad antioxidante son diferentes ($p > 0.05$)

Xu y Chang en 2009 estudiaron el efecto del procesamiento (cocción al vapor a presión atmosférica y presión controlada) sobre los compuestos fenólicos totales y propiedades antioxidantes de las variedades de frijol pinto y negro obtenidos en Kimberly, Idaho, USA. Ellos encontraron que en comparación con el frijol crudo el contenido de compuestos fenólicos decrece significativamente, sin embargo resulta en la retención de la actividad antioxidante determinado por DPPH[•], FRAP y ORAC cercana al 80%.

Estudios han evaluado el efecto de la cocción tradicional, cocción al vapor a presión atmosférica y de la cocción al vapor a presión controlada sobre el contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de frijoles negros obtenidos en Kimberly, Idaho, USA. Ellos concluyen que el cocinado a presión atmosférica comparada con la cocción tradicional no presentó diferencia significativa en el contenido de compuestos fenólicos totales. El procesamiento al vapor a presión atmosférica controlada retiene mayor cantidad de compuestos fenólicos y actividad antioxidante que el cocinado tradicional. El cocinado al vapor a presión controlada muestra un incremento en la actividad antioxidante comparado con cocinado al vapor a presión atmosférica (Xu y Chang, 2008). Ellos concluyen que diferentes métodos de procesamiento presentan variados efectos de retención de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante.

Los resultados mostrados, señalan que existe entre las diferentes variedades y sus métodos de procesamiento unavariada actividad antioxidante caracterizada por su diferente porcentaje de inhibición. De acuerdo a la actividad antioxidante determinada mediante ambos métodos, las variedades guardan el siguiente orden de mayor a menor valor, negro > pinto > flor de mayo > bayo > mayocoba.

La mayor o menor actividad, no siempre está relacionada con la concentración de compuestos fenólicos totales, así Okawa y col. (2001) reportaron que cuando se evalúa la capacidad de secuestro de radicales libres no siempre es importante el contenido de polifenoles sino la posición del grupo hidroxilo. Singh y col. (1999) mencionan que el coeficiente de inhibición varía dependiendo de la granulometría

de las muestras, el lugar de origen, las condiciones climáticas y el tratamiento de los alimentos.

Por otro lado se observan diferencias entre los diferentes productos de procesamiento obtenidos mediante diferentes tratamientos, que de acuerdo con el porcentaje de inhibición del radical ABTS^{•+}, se ordenan en forma descendente de la siguiente manera frijol crudo > grano presión > grano vaporera > grano olla > caldo olla > caldo presión > caldo vaporera > agua de remojo. En tanto, en la evaluación de la actividad antioxidante determinada con el radical DPPH[•], el orden en el cual se agrupan los productos de procesamiento de los diferentes métodos de cocción es el siguiente, de mayor a menor: frijol crudo > grano vaporera > grano presión > grano olla > caldo vaporera > caldo presión > caldo olla > agua de remojo.

En la tabla 7 se muestra la correlación que existe entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante, es decir si la cantidad de compuestos fenólicos es la que determina la capacidad de inhibición de radicales libres. Se observó que los compuestos fenólicos son directamente proporcionales a la actividad antioxidante que presenta el frijol ante el radical ABTS^{•+} y DPPH[•], en todos los productos de procesamiento obtenidos mediante los tres métodos de cocción.

La pérdida de compuestos fenólicos no siempre está relacionada con la inhibición de su capacidad antioxidante, de esta forma podemos observar que los porcentajes de pérdida de inhibición de radicales libres pueden ser menores al porcentaje de pérdida de compuestos fenólicos.

Muchos trabajos relacionan la capacidad antioxidante con el contenido de compuestos fenólicos; sin embargo la naturaleza de cada componente fenólico puede contribuir de forma y proporción diferente. También existen estudios en los cuales no se han encontrado relación alguna entre el contenido de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante. No obstante en éste caso se observa que los frijoles con testa coloreada que contienen la mayor concentración de compuestos fenólicos son los que presentan mayor actividad antioxidante.

Tabla 7. Correlación de compuestos fenólicos y actividades antioxidantes

Variedad	Actividad Antioxidante	
	ABTS ^{•+}	DPPH [•]
Frijol crudo	0.87	0.93
Agua de remojo	0.95	0.88
Grano Vaporera	0.97	0.95
Caldo Vaporera	0.88	0.52
Grano Olla	0.96	0.87
Caldo Olla	0.91	0.93
Grano Presión	0.99	0.96
Caldo Presión	0.84	0.81

Es sabido que los frijoles de testa oscura contienen compuestos fenólicos pertenecientes a la familia de las antocianinas (delfinidina, malvidina y petunida) que son las que presentan mayor capacidad antioxidante, mientras los frijoles de testa clara como el mayocoba son más abundantes en flavonoles, específicamente kaempferol (Luthria y Pastor, 2006). Es necesario tomar en cuenta que dicha consideración no sólo dependerá de la concentración y la calidad antioxidante, sino también de su interacción con otros componentes y la metodología aplicada.

La correlación que existe entre el porcentaje de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante es de $r^2= 0.97$ para el radical ABTS^{•+} y $r^2= 0.90$ para el ensayo con el radical DPPH[•].

Los compuestos fenólicos totales presentan diversa capacidad antioxidante, el hecho que muchos de estos productos funcionen mejor en mezclas permite suponer que en condiciones en las cuales se encuentren varios de estos compuestos con diferente capacidad antioxidante los muy reactivos reduzcan los radicales más activos, mientras que otros menos reactivos actúen regenerando los de primera línea (Re y col., 1999).

5. CONCLUSIONES

Conclusiones

Los procesos térmicos utilizados en éste estudio disminuyen la concentración de compuestos fenólicos totales así como las actividades antioxidantes de las variedades de frijol.

La capacidad de inhibición de los radicales $ABTS^{\cdot+}$ y $DPPH^{\cdot}$ es directamente proporcional a la concentración de compuestos fenólicos presentes en el frijol y sus productos de procesamiento.

En este estudio contenido de compuestos fenólicos puede ser un parámetro que nos indique la capacidad antioxidante de un alimento.

El método de procesamiento en agua hirviendo a presión controlada mostró la menor pérdida de compuestos fenólicos totales y la mayor inhibición de los radicales $ABTS^{\cdot+}$ y $DPPH^{\cdot}$.

6. SUGERENCIAS

Debido a la importancia que tienen los compuestos que muestran propiedades antioxidantes y el significativo consumo de frijol en nuestro país y muchos países en vías de desarrollo, resulta importante continuar la línea de investigación, se sugiere:

Estudios con radicales de mayor importancia biológica para comprobar la actividad antioxidante.

Analizar el efecto que tiene el procesamiento industrial en el contenido de compuestos fenólicos totales y las propiedades antioxidantes en el frijol enlatado.

Identificación de los compuestos fenólicos presentes en las variedades de frijol mexicano de mayor consumo.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abd, E. I., & Habiba, R. A. (2003). Effect of soaking and extrusion conditions on antinutrients and protein digestibility of legume seeds. *Food Science and Technology* , 36 (3), 285-293.
- Ader, P., Grenacher, B., Langguth, P., Scharrer, E., & Wolfram, S. (1996). Cinnamate uptake by rat small intestine: transport kinetics and transepithelial transfer. *Experimental Physiology* , 81 (6), 943-955.
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* , 127, 183-198.
- Arnao, M. B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Science and Technology* , 11 (11), 419-421.
- Badui-Dergal, S. (1999). *Química de los alimentos*. México: Pearson, 123-128
- Bakr, A. A. (1991). Nutritional evaluation and cooking quality of dry cowpea (*Vigna signesis* L.) grown under various agricultural conditions. I. Effect of soaking and cooking on the chemical composition and nutritional quality of cooked seed. *Journal of Food Science and Technology* , 28 (2), 312-316.
- Bazzano, L. A. (2001). Legume consumption and risk of coronary heart disease in US men and women. *Archives of Internal Medicine* , 161 (21), 2573-2578.
- Boateng J., V. M. (2008). Effect of processing on antioxidant contents in selected dry beans (*Phaseolus* spp. L.). *Food Science and Technology*, 41, 1541-1547.
- Cai, Y. Z., Sun, M., Xing, J., Luo, Q., & Corke, H. (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences* , 78 (25), 2872-2888.

Cancino, B. L., Leiva, G. A., Garrido, G., Cossio, A. M., & Prieto, G. M. (2001). VIMANG: los efectos antigenotóxico y modulador de las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa. *Revista Cubana de Investigación Biomédica* , 20 (1), 48-53.

Clemente, A., & Domony, C. (2001). *Anticarcinogenic activity of protease inhibitors in legumes in Proceedings of the 4th European Conferences on Grain Legumes, Towards the Sustainable Production of Healthy Food, Feed and Novel Products*. Paris, France: Association Europeenne de recherche sur les Proteagineux, 1, 114-115.

Cuevas-Montilla, E., Antezana, A., & Winterhalter, P. (2008). Análisis y caracterización de antocianinas en diferentes variedades de maíz (*Zea mays*) boliviano. *Red-alfa lagrotech. Comunidad europea* , Memorias Cartagena, 13, 79-95.

Dave Oomah, B., Corbé, A., & Balasubramanian, P. (2010). Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Hulls. *Journal Agricultural and Food Chemistry* , 58 (14),8225-8230.

De Mejía, E., Guzmán, S. H., Acosta, J. A., & Reynoso, R. (2003). Effect of cultivar and growing location on the trypsin inhibitors, tannins, and lectins of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in the semiarid highlands of Mexico. *Journal Agriculture and Food Chemistry* , 51 (20), 5962-5966.

Dewanto, V., Wu, X., & Liu, R. H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal Agriculture and Food Chemistry* , 50 (10), 3010-3014.

Díaz-Batalla, L., Widholm, J., Fahey, G., Castaño-Tostado, E., & Parédes-López, O. (2006). Chemical Components with Health Implications in Wild and Ciltivated Mexican Common Bean Seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 54, 2045-2052.

Dueñas, M., Hernández, T., & Estrella, I. (2006). Assessment of in vitro antioxidant capacity of the seed coat and the cotyledon of legumes in relation to their phenolic contents. *Food Chemistry* , 98 (1), 95-103.

Gálvez, L., Genovese, M. I., & Lajolo, M. (2007). Polyphenols and Antioxidant Capacity of Seed Coat and Cotyledon from Brazilian and Peruvian Bean Cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 55, 90-98.

González, M., & Pedraza, G. (2005). *Generalidades del fríjol*. Querétaro: ITESM, 2-9.

Gutiérrez Avella, D. M., Ortiz García, C. A., & Mendoza Cisneros, A. (2008). Simposio Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas usadas para Alimentación Animal. *Simposio de Metrología. Universidad Autónoma de Querétaro* , 11081-11085.

Hangsber, W. (2002). Biología de la especies reactivas de oxígeno. *Mensaje Bioquímico. Instituto de Fisiología Celular. UNAM* , 26, 19-24.

Harbone, J. B. (1976). *Function of flavonoids in plants*. In "*Chemistry and Biochemistry of Plants Pigments*". London: Academic Press, 65.

Hecht, E. (2001). *Fundamentos de física*. México: Thomson Learning, 46-48.

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal Agriculture and Food Chemistry* , 53, 1841-1856.

Imeh, U., & Khokhar, S. (2002). Distribution of conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations. *Journal Agriculture and Food Chemistry* , 50 (22), 6301-6306.

Jacinto, H., Azpiroz R., H. S., Acosta G., J., & Bernal L., I. (2002). Caracterización de una población de líneas endogámicas de frijol común por su calidad de cocción y algunos componentes nutrimentales. *Agrociencia* , 36(4), 451-459.

- Julkunen, T. R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of Northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. *Journal Agricultural and Food Chemistry* , 33 (2), 213-217.
- Kim, D. O., Chun, O. K., Kim, Y. J., Moon, H. Y., & Lee, C. Y. (2003). Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal Agriculture and Food Chemistry* , 51 (22), 6509-6515.
- Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. *Journal Agriculture and Food Chemistry* , 50, 3713-3717.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., García, M. C., & Fett, A. G. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos anocianicos. *Revista Brasileña de Ciencia y Tecnología de Alimentos* , 24 (4), 691-693.
- Lander, H. M. (1997). An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB Journal* , 11, 118-124.
- Leopodini, M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry* , 125, 288-290.
- López Martínez, L. X., Dublán-García, O., & Baeza-Jiménez, R. (2012). Compuestos fenólicos toales, flavonoides y actividad antioxidante de 4 diferentes variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) mexicano. *IX Encuentro. Participación de la mujer en la ciencia* , 1-5.
- López-Martínez, L. X., Oliart-Ros, R. M., Valerio-Alfaro, G., Lee, C.-H., Parkin, K. L., & García, H. S. (2008). Antioxidant activity, phenolic compounds and antocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *Elsevier* , 42, 1187-1192.
- Luthria, D. L., & Pastor, M. A. (2006). Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *Journal Food Composition and Analysis* , 19, 205-211.

- Martínez-Flores, A., González-Gallegos, J., Culebras, J. M., & Tunón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria* , 17 (6), 271-278.
- Martínez-Preciado, A. H., Naranjo-Figueroa, A., & Nungaray-Arellano, J. (2004). Antocianinas, flavonoides y ácidos fenólicos presentes en frijol Negro Querétaro y Mayocoba y su estabilidad durante el cocimiento industrial. *CUCEI-Universidad de Guadalajara*, 6-9.
- Matthews, R. (1990). *Legumes, Chemistry, Technology and Nutrition*. USA: Marcel Dekker, 187-191.
- Mederos, Y. (2006). Indicadores de la Calidad en el grano de frijol (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Cultivos Tropicales. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) La Habana, Cuba* , 28 (4), 55-62.
- Miller, J. K., & Brzezinska, S. E. (1999). Oxidative Stress, antioxidants, and Animal Function. *Journal of Dairy Science* , 76 (9), 2812-2823.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science and Technology* , 26(2), 211-219.
- Montoya, B., Lemeshko, V., López, J. B., Pareja, A., Urrego, R., & Torres, R. (2003). Actividad antioxidante de algunos extractos vegetales. *Vitae* , 10 (2), 72-79.
- Moon, Y. J., Wang, X., & Morris, M. E. (2006). Dietary Flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in vitro* , 20 (2), 187-210.
- Muñoz, A. M., & Ramos, F. (2007). Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomedicinales. *Horizonte Médico* , 7 (1), 23-31.
- Naczki, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* , 1054 (1-2) , 95-111.

Narayana, K., Reddy, R., Sripal, M., & Krishna, D. R. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical, effects and therapeutic potencial. *Indian Journal Pharmacology* , 33, 2-16.

Okawa, M., Kinjo, J., Nohara, T., & Ono, M. (2001). DPPH (1, 1 diphenyl- 2 picrylhydrazyl) Radical Scavenging Activity of Flavonoid Obtained from Some Medicinal Plants. *Biol. Pharm* , 24, 1202-1205.

Pellegrini, G., Miller, N., & Rice-Evans, C. A. (1999). Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid). In L Parcker (Ed.), *Methods in enzymology*. New York: Academic Press , 299, 379-389.

Pérez-Herrera, P. (2002). Caracterización física, culinaria y nutricional del frijol del antiplan subhúmedo de México. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* , 14, 110-116.

Pietta, P. G., Gardana, C., & Mauri, P. L. (2000). Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) of Ginkgo biloba flavonol and Camellia sinesis catechin metabolites. *Journal of Farmaceutical and Biomedical Analysis* , 23 (1), 223-226.

Pitura, K. (2011). *Evaluation of the Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of Extracts and Flavonol Glycosides isolated from the Seed Coats of Coloured Beans (Phaseolus vulgaris L.)*. Manitoba: Tesis para obtener el Título de Maestra en Ciencias en la Universidad de Manitoba, 15-49.

Pourmorad, F., Hosseinimehr, S., & Shahabimajid, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* , 45, 1142-1145.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* , 31 (4), 1231-1237.

- Reyes-Rivas, E., Padilla-Bernal, L. E., Pérez-Veyna, O., & López-Jáquez, P. (2008). Historia, naturaleza y cualidades alimentarias del frijol. *Revista Investigación Científica Nueva Época* , 56, 1-21.
- Reynoso, R., Ríos, M. C., Torres, I., Acosta, J. A., & Palomino, A. C. (2007). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) consumption and its effects on colon cancer in Sprague.Dawley rats. *Agricultura Técnica en México*,14 (3), 43-52.
- Rodríguez-Licea, G., García-Salazar, J. A., Rebollar-Rebollar, S., & Cruz-Contreras, A. C. (2010). Preferencias del consumidor de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en México: factores y características que influyem en la decisión de compra diferenciada por tipo y variedad, 18, 121-129.
- Rodríguez-Saona, L., & Wrolstad, R. E. (2001). Extraction, Isolation and Purification of Anthocyanins. In "Current Protocols in Food Analytical Chemistry". *John Wiley and Sons* , 1.
- Ross, K., Beta, T., & Arntfield, S. D. (2009). A comparative study on the phenolic acids identified and quantifies in dry bean using HPLC as affected by diferente extraction and hydrolysis methods. *Food Chemistry*, 113 (5), 1178-1183.
- SAGARPA. (2008). Situación actual y perspectivas de la producción de Frijol en México. *Coordinación general de granos y leguminosas* .
- Salinas, M. Y., Rojas, H. L., E. Sosa, M., & P. Pérez, H. (2005). Composición de antocianinas en variedades de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas en México. *Agrociencia* , 56, 385-394.
- Scalbert, A. C., & Morand, C. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 25 (2), 297-306.
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary Intake and Bioavailability of Poliphenols. *Journal Nutrition* , 130 (5), 346-356.

Sellapan, S., Akoh, C. C., & Krewer, G. (2002). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-Grown blueberries and blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 87, 2432-2438.

Serrano, J., & Goñi, I. (2004). Papek del frijol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional de la población guatemalteca. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* , 12, 36-46.

Serrano, J., & Goñi, I. (2004). Papel del frijol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional de población guatemalteca. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 34, 79-94.

Singh, H. P., Ravindranath, S. D., & Singh, C. (1999). Analysis of tea shoot catechins: Spectrophotometric quantitation and selective visualization on two-dimensional paper chromatograms using diazotized sulfanilamide. *Journal Agriculture and Food Chemistry* , 47, 1041-1045.

Téllez-Guzmán, V. (2003). Proyecto de fomento a la producción y la competitividad del Fríjol en el norte de Guanajuato Región Ocampo-San Felipe. *Celaya, Guanajuato* , 2, 506-513.

Terrence, M., & Ferreidoon, S. (2005). Antioxidant Potential of Pea Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Science* , 70 (1), 85-90.

Thompson, M., Brick, M., McGinley, J., & Thompson, H. (2009). Chemical Composition and Mammary Cancer Inhibitory Activity of Dry Bean. *Crop Science Society of America*, 49, 179-186.

Tobar, J. (1992). *Bioavailability of Starch in processed legumes. Importance of physical inaccessibility and retrogradation*. Suecia: Tesis Doctoral. Universidad de Lund.

Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2006). The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-

hydroxy substituted members. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 25, 140-146.

Ulloa, J. A., Rosas-Ulloa, P., Ramírez-Ramírez, J. C., & Ulloa-Rangel, B. E. (2011). El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Universidad Autónoma de Nayarit*, 35, 5-9.

Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., & Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecology and Environmental Safety*, 15, 178-189.

Valls, V., Torres, C. M., Muñoz, P., Boix, L., González, M., & Codoñer-Franch, P. (2004). The protective effects of melanoidins in adriamycin-induced oxidative stress in rat isolated hepatocytes. *Journal Science Food and Agriculture*, 84, 1701-1707.

Venero, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 11 (2), 126-133.

Voysest-Voysest, O. (2000). *Variedades de frijol en América Latina y su origen*. Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 10, 110-117.

Xu, B. J., & Chang, S. K. (2008). Total phenolic content and antioxidant properties of eclipse black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by processing methods. *Journal of Food Science*, 73, 306-311.

Xu, B. J., & Chang, S. K. (2009). Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, Flavan-3-ol, and Flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4754-4764.

Xu, B. J., Yuan, S. H., & Chang, S. K. (2007). Comparative Studies on the Antioxidant Activities of Nine Common Food Legumes Against Copper-Induced Human Low-Density Lipoprotein Oxidation In Vitro. *Journal of Food Science*, 72 (7), 522-527.

8. ANEXOS

ANEXO A.

Curva de calibración para la determinación de compuestos fenólicos totales

Se preparó una disolución patrón de ácido gálico de 0.1 g/L, para lo cual se pesaron 25 mg de ácido gálico, se colocaron en un matraz aforado de 25 mL y se llevaron a volumen con agua destilada, enseguida se preparó una disolución 1:10 con agua destilada (siempre se utiliza una disolución recién preparada).

De la misma manera se preparó una disolución de carbonato de sodio al 20% pesando 5 g de carbonato de sodio en un matraz aforado de 25 mL.

Por otro lado se preparó una disolución 1N del reactivo Folin-Ciocalteu, por medio de una dilución 1:2 del reactivo comercial 2 N en agua destilada; el reactivo se colocó en un frasco color ámbar protegido de la luz hasta su uso.

A partir de la disolución patrón de ácido gálico, en tubos protegidos de la luz, se hicieron las diluciones necesarias con agua destilada para obtener concentraciones de 0 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L, 3 mg/L, 4 mg/L y 5 mg/L para la preparación de la curva de calibración. Esto se realizó tomando respectivamente 20 μ L, 40 μ L, 60 μ L, 80 μ L y 100 μ L de la disolución patrón de ácido gálico de 0.1 g/L, luego se adicionó a cada tubo 250 μ L de reactivo de Folin Ciocalteu 1N, se dejó reposar durante 5 min, posteriormente se adicionaron 1 250 μ L de la disolución de carbonato de sodio al 20 % a cada tubo, se llevó a un volumen final de 2 mL con agua destilada y se dejó reposar por 2 h. También se preparó un blanco con todos los componentes excepto la disolución de ácido gálico. Finalmente se determinó la absorbancia a 760 nm en el espectrofotómetro de ultravioleta-visible.

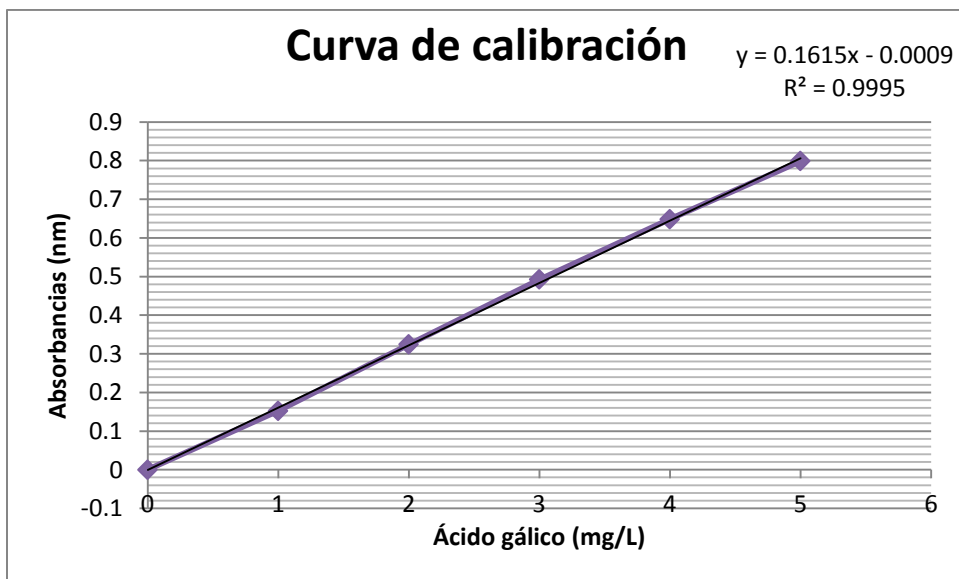


Figura 21. Curva de calibración de contenido de compuestos fenólicos totales

ANEXO B.

Determinación de actividad antioxidante por el método de ABTS

Preparación de reactivos

Para la preparación de la solución de ABTS 7 mM se disolvieron en 10 de agua destilada 0.0384 g de sal amónica cristalizada de ABTS.

La solución de persulfato de potasio se preparó disolviendo 0.0662 g del reactivo en 100 mL de agua destilada.

Para la preparación del radical ABTS^{•+} se obtuvo mediante la mezcla de 5 mL de la solución de ABTS y 88 μ L. La mezcla se mantuvo en obscuridad a temperatura ambiente durante 12 horas para la formación del radical.

Determinación de la actividad antioxidante

La solución de ABTS^{•+} se diluyó con etanol para obtener una absorbancia de 0.74 a 734 nm, esto se consigue mezclando 2.5 mL de la solución del radical con 100 mL de etanol.

Los extractos fueron probados a concentraciones de 0 a 1 mg/mL de compuestos fenólicos y se diluyeron con metanol hasta observar una absorbancia de 0.74 a 734 nm.

Se transfirieron 190 μ L de cada extracto a una celda de cuarzo, se adicionó 1 mL de la solución de ABTS^{•+} preformado y se dejaron reaccionar durante 10 min.

Se determinaron las absorbancias a 734 nm.

Se utilizó Trolox como antioxidante referencia, el cual se trató de la misma forma que los extractos.

Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH

1. Se prepararon 100 mL de una solución de DPPH- (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) en etanol acuoso para lo cual se colocaron 80 mL de etanol puro a la cual se adicionaron 20 mL de agua destilada. A ésta mezcla se le agregaron 20 mg del radical DPPH- y se homogenizó.
2. Luego se preparó una solución metanólica de los extractos en una concentración de 300 mg/mL, los extractos utilizados contenían entre 0 y 1 mg/mL de compuestos fenólicos.
3. El blanco se preparó con metanol en agua al 80% para ajustar el espectrofotómetro a cero.
4. El patrón de referencia se preparó con 1.5 mL de DPPH- y 0.75 mL de agua.
5. Se procedió a preparar las muestras se colocaron 100 μ L de cada extracto y se adicionaron 2.9 mL de la solución del radical DPPH-.
6. Se utilizó trolox 0.20 mM como referencia antioxidante y se le agregó 2.9 mL de la solución del radical DPPH-.
7. Los extractos, el blanco y la referencia se dejaron reposar en ausencia de luz a temperatura ambiente durante 30 min.}
8. Se leyó la absorbancia a 517 nm. Todos los extractos fueron evaluados por triplicado.

ANEXO C

ANOVA de comparación de medias (Compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante) de cada variedad de frijol

Frijol Bayo

- **Grano**

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
dpph1	Inter-grupos	3169.361	3	1056.454	514.170	.000
	Intra-grupos	16.437	8	2.055		
	Total	3185.798	11			
cft1	Inter-grupos	883.753	3	294.584	166.767	.000
	Intra-grupos	14.132	8	1.766		
	Total	897.884	11			
abts1	Inter-grupos	3916.199	3	1305.400	644.304	.000
	Intra-grupos	16.208	8	2.026		
	Total	3932.408	11			

- **Caldo**

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
dpph6	Inter-grupos	9.464	3	3.155	1.366	.321
	Intra-grupos	18.470	8	2.309		
	Total	27.934	11			
cft6	Inter-grupos	20.440	3	6.813	37.487	.000
	Intra-grupos	1.454	8	.182		
	Total	21.894	11			
abts6	Inter-grupos	227.169	3	75.723	14.270	.001
	Intra-grupos	42.451	8	5.306		
	Total	269.620	11			

Frijol Flor de Mayo

- **Grano**

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
dpph2	Inter-grupos	3343.850	3	1114.617	966.353	.000
	Intra-grupos	9.227	8	1.153		
	Total	3353.078	11			
cft2	Inter-grupos	934.733	3	311.578	171.850	.000
	Intra-grupos	14.505	8	1.813		
	Total	949.238	11			
abts2	Inter-grupos	2884.287	3	961.429	185.809	.000
	Intra-grupos	41.394	8	5.174		
	Total	2925.681	11			

- **Caldo**

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
dpph7	Inter-grupos	213.301	3	71.100	9.686	.005
	Intra-grupos	58.724	8	7.341		
	Total	272.025	11			
cft7	Inter-grupos	51.551	3	17.184	5.048	.030
	Intra-grupos	27.233	8	3.404		
	Total	78.784	11			
abts7	Inter-grupos	3037.234	3	1012.411	5.573	.023
	Intra-grupos	1453.241	8	181.655		
	Total	4490.475	11			

Frijol Mayocoba

- **Grano**

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
dpph3	Inter-grupos	3237.491	3	1079.164	211.982	.000
	Intra-grupos	40.727	8	5.091		
	Total	3278.218	11			
cft3	Inter-grupos	466.344	3	155.448	40.159	.000
	Intra-grupos	30.967	8	3.871		
	Total	497.311	11			
abts3	Inter-grupos	3726.162	3	1242.054	125.718	.000
	Intra-grupos	79.037	8	9.880		
	Total	3805.200	11			

- **Caldo**

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
dpph8	Inter-grupos	22.587	3	7.529	25.734	.000
	Intra-grupos	2.341	8	.293		
	Total	24.928	11			
cft8	Inter-grupos	2.794	3	.931	12.196	.002
	Intra-grupos	.611	8	.076		
	Total	3.405	11			
abts8	Inter-grupos	24.549	3	8.183	3.202	.084
	Intra-grupos	20.444	8	2.556		
	Total	44.993	11			

Frijol Negro

- **Grano**

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
dpph4	Inter-grupos	5680.534	3	1893.511	194.342	.000
	Intra-grupos	77.945	8	9.743		
	Total	5758.480	11			
cft4	Inter-grupos	1202.715	3	400.905	52.184	.000
	Intra-grupos	61.461	8	7.683		
	Total	1264.176	11			
abts4	Inter-grupos	2237.088	3	745.696	11.955	.003
	Intra-grupos	499.019	8	62.377		
	Total	2736.107	11			

- **Caldo**

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
dpph9	Inter-grupos	19.972	3	6.657	3.938	.054
	Intra-grupos	13.524	8	1.690		
	Total	33.496	11			
cft9	Inter-grupos	8.531	3	2.844	2.448	.138
	Intra-grupos	9.292	8	1.162		
	Total	17.823	11			
abts9	Inter-grupos	105.373	3	35.124	1.748	.235
	Intra-grupos	160.790	8	20.099		
	Total	266.162	11			

Frijol Pinto

- **Grano**

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
dpph5	Inter-grupos	4055.614	3	1351.871	132.409	.000
	Intra-grupos	81.679	8	10.210		
	Total	4137.292	11			
cft5	Inter-grupos	1223.967	3	407.989	45.256	.000
	Intra-grupos	72.122	8	9.015		
	Total	1296.089	11			
abts5	Inter-grupos	5206.078	3	1735.359	41.683	.000
	Intra-grupos	333.059	8	41.632		
	Total	5539.136	11			

- **Caldo**

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
dpph10	Inter-grupos	350.651	3	116.884	1.012	.436
	Intra-grupos	923.761	8	115.470		
	Total	1274.412	11			
cft10	Inter-grupos	17.731	3	5.910	1.720	.240
	Intra-grupos	27.484	8	3.435		
	Total	45.215	11			
abts10	Inter-grupos	134.124	3	44.708	1.874	.212
	Intra-grupos	190.900	8	23.862		
	Total	325.024	11			